



Escuela de Doctorado de la Universidad de Cantabria

Programa de Doctorado en Biología Molecular y Biomedicina

Regulación epigenética de la condrogénesis y la muerte celular programada durante el desarrollo embrionario de las extremidades

**Director:
Dr. Juan M. Hurlé González**

**Tesis Doctoral presentada por Cristina Sánchez Fernández
para optar al Grado de Doctor por la Universidad de Cantabria
Santander, 2019**

D. JUAN M. HURLÉ GONZÁLEZ, Catedrático del área de Anatomía Humana y Embriología del Departamento de Anatomía y Biología Celular de la Facultad de Medicina de la Universidad de Cantabria.

CERTIFICA:

Que Dña. **Cristina Sánchez Fernández**, graduada en Biología, ha realizado bajo su dirección el presente trabajo de Tesis Doctoral titulado: “Regulación epigenética de la condrogénesis y la muerte celular programada durante el desarrollo embrionario de las extremidades”.

Considero que dicho trabajo se encuentra terminado y reúne los requisitos para su presentación como Memoria de Doctorado al objeto de poder optar al Grado de Doctor por la Universidad de Cantabria.

Y para que conste y surta los efectos oportunos, expido el presente certificado en Santander, a de Diciembre de 2019.

Fdo. Juan M. Hurlé González

Esta Tesis Doctoral ha sido financiada por las siguientes ayudas:

- Ayuda predoctoral de formación de personal investigador (FPI; BES-2015-074267) asociada al proyecto de investigación (BFU2014-54026-P). Ministerio de Economía y Competitividad.

Hace cuatro años escribía, con emoción y cierto miedo, la declaración de interés que todo aquel que desea formar parte del programa de doctorado en Biología Molecular y Biomedicina de la Universidad de Cantabria debe adjuntar junto a su solicitud. Una carta en la que me refería, sin casi experiencia, a la investigación como “una forma de vida dura y sacrificada en la que cada paso hacia delante, a pesar de ser en ocasiones minúsculo y costoso, merece la pena y te hace estar más cerca del objetivo final, que no es otro, que intentar entender, con los medios de los que disponemos, el mecanismo más complejo y regulado que existe, la vida”. Cuatro años más tarde escribo, con las mismas sensaciones, los agradecimientos de los muchos quebraderos de cabeza que me han acompañado durante este tiempo; cuando mis resultados diferían de los presentados en otros trabajos publicados o cuando, tras varias semanas de largos experimentos, éstos no salían como había pensado. Con emoción, al recordar todos aquellos momentos en los que sentí una enorme satisfacción al atar cabos y responder, basándome en mis experimentos y resultados, a la hipótesis previa que nos habíamos planteado. Con miedo, porque como decía una buena compañera “amiga, la vida es un lugar peligroso”; se cierra una de las etapas más importantes de mi vida y ¿qué será lo próximo?

Todas esas vivencias, los conocimientos y la experiencia profesional, las horas de práctica que todas manos necesitan para desempeñar en condiciones un trabajo; así como la capacidad para resolver los problemas y las dificultades que la investigación científica plantea, se resumen hoy en esta Tesis Doctoral.

En primer lugar, me gustaría agradecer a mi director de Tesis, el profesor Juan M. Hurlé, el haberme dado la oportunidad de iniciar mi carrera investigadora bajo su dirección. Gracias por su entrega, por el tiempo dedicado a este trabajo y por confiar en mis capacidades desde el primer momento. También quiero agradecer a los profesores Juan Antonio Montero y Carlos Ignacio Lorda su disposición, tiempo y amabilidad; sin vuestra aportación estas páginas no conformarían hoy una Tesis.

Quiero hacer una especial mención al resto de miembros del laboratorio: Sonia Pérez, Montserrat Fernández y Susana Dawalibi, gracias por vuestra constante ayuda, consejos y apoyo durante estos 4 años.

Gracias al Dr. Ramón Merino y al profesor Miguel Lafarga por haber seguido mi andadura científica a lo largo de este importante periodo de mi vida, por darme un punto de vista diferente y permitirme, en muchas ocasiones, ver la luz al final del túnel.

A todos los miembros del Dpto. de Anatomía y Biología Celular, donde he realizado mi trabajo investigador, así como del Dpto. de Fisiología y Farmacología; gracias por haberme prestado vuestra ayuda, por los ánimos y los recursos que habéis puesto a mi alcance.

Por último, quiero también mostrar mi agradecimiento a todas aquellas personas que de un modo u otro han colaborado en la realización de este trabajo y han conseguido que sea lo que hoy es. Muchas gracias a todos.

A mi familia, en especial a mis padres,
por haberme permitido llegar hasta aquí

ÍNDICE

ABREVIATURAS.....	1
1. INTRODUCCIÓN	5
2. ESTADO ACTUAL DEL PROBLEMA.....	9
2.1 ORGANIZACIÓN DEL MATERIAL GENÉTICO	11
2.2 CROMATINA Y EPIGENÉTICA	14
<i>2.2.1 Modificaciones epigenéticas de la cromatina</i>	<i>15</i>
2.2.1.1 Metilación del ADN	16
2.2.1.2 Modificaciones postraduccionales de las histonas	21
2.2.1.2.A Acetilación de las colas de las histonas	21
2.2.1.2.B Metilación de las colas de las histonas	23
2.2.1.3 Remodeladores de la cromatina	25
2.2.1.3.A Complejos remodeladores de la cromatina	25
2.2.1.3.B Proteínas de alta movilidad (HMG)	27
2.2.1.3.C UHRFs	29
2.2.1.4 ARNs no codificantes	31
2.3 DAÑO EN EL ADN	33
2.3.1 Respuesta a la rotura del ADN	33
2.3.2 Reparación de la rotura del ADN	36
2.3.3 Consecuencias del daño en el ADN	38
2.3.3.1 Senescencia	38
2.3.3.2 Apoptosis	39
2.3.3.2.A Vía intrínseca, vía de estrés o mitocondrial	40
2.3.3.2.B Vía extrínseca	41
2.4 FORMACIÓN DE LAS EXTREMIDADES DURANTE EL DESARROLLO EMBRIONARIO	43
2.4.1 Condrogénesis	43
2.4.2 Apoptosis durante la formación de las extremidades	47
2.4.3 Epigenética durante la formación de las extremidades	48
2.4.3.1 Metilación del ADN	49
2.4.3.2 Modificaciones postraduccionales de las histonas	50
2.4.3.2.A Acetilación de las colas de las histonas	50
2.4.3.2.B Metilación de las colas de las histonas	51
2.4.3.3 Modificaciones de la cromatina	52
2.4.3.4 ARNs no codificantes	53
3. OBJETIVOS	55
4. MATERIAL Y MÉTODOS.....	59
4.1 MODELOS ANIMALES	61
4.2 OBTENCIÓN Y PROCESAMIENTO DEL TEJIDO BIOLÓGICO	61
4.2.1 Extracción del tejido embrionario del espacio interdigital	61
4.2.2 Obtención de disociados celulares: Técnica del squash	62
4.2.3 Cortes histológicos en vibratomo	63
4.2.4 Cultivos Celulares	63
4.2.4.1 Cultivos en alta densidad o micromasas	63
4.2.4.1.A Nucleofección de plásmidos y siRNAs	64
4.2.4.1.B Tratamiento con inhibidores de DNMT	65
4.2.4.2 Cultivos de explantes del tejido del espacio interdigital	65
4.3 IMPLANTACIÓN DE MICROESFERAS	65

4.4 MODELOS EXPERIMENTALES DE RADIACIÓN IONIZANTE	66
4.5 TÉCNICAS DE BIOLOGÍA CELULAR	66
4.5.1 <i>Marcaje para la detección de la actividad de la β-galactosidasa</i>	<i>66</i>
4.5.2 <i>Tinción del tejido esquelético con Azul Alcán</i>	<i>67</i>
4.5.2.1 <i>Tinción con Azul Alcán de los cultivos de micromasas</i>	<i>67</i>
4.5.3 <i>Detección de la muerte celular con el colorante vital Rojo Neutro</i>	<i>68</i>
4.6 TÉCNICAS DE MICROSCOPIA CONFOCAL	68
4.6.1 <i>Inmunofluorescencia</i>	<i>68</i>
4.6.1.1 <i>Inmunofluorescencia en disociados celulares.....</i>	<i>68</i>
4.6.1.1.A <i>Detección de la metilación del ADN</i>	<i>69</i>
4.6.1.2 <i>Inmunofluorescencia en cortes histológicos de vibratomo</i>	<i>70</i>
4.6.1.3 <i>Inmunofluorescencia en cultivos de alta densidad o micromasas.....</i>	<i>70</i>
4.6.2 <i>Detección de la muerte celular mediante TUNEL (Terminal transferase-mediated dUTP Nick End Labeling).....</i>	<i>71</i>
4.7 TÉCNICAS DE BIOLOGÍA MOLECULAR	71
4.7.1 <i>Obtención de Sondas Antisentido para Hibridación in situ</i>	<i>71</i>
4.7.1.1 <i>Diseño de oligonucleótidos cebadores para PCR</i>	<i>72</i>
4.7.1.2 <i>PCR</i>	<i>72</i>
4.7.1.3 <i>Extracción de bandas y ligación.....</i>	<i>74</i>
4.7.1.4 <i>Transformación de la cepa DH5α de Escherichia coli.....</i>	<i>74</i>
4.7.1.5 <i>Purificación del ADN plasmídico de las bacterias transformadas</i>	<i>75</i>
4.7.1.6 <i>Digestión y linealización del ADN plasmídico</i>	<i>76</i>
4.7.1.7 <i>Purificación del plásmido linealizado</i>	<i>76</i>
4.7.1.8 <i>Transcripción y purificación de la sonda</i>	<i>76</i>
4.7.2 <i>Hibridación in situ</i>	<i>77</i>
4.7.2.1 <i>Hibridación in situ en cortes histológicos de vibratomo</i>	<i>79</i>
4.7.3 <i>Análisis de la expresión génica por PCR cuantitativa</i>	<i>79</i>
4.7.3.1 <i>Extracción del ARN total.....</i>	<i>79</i>
4.7.3.2 <i>Transcripción reversa o Retrotranscripción de ARN</i>	<i>79</i>
4.7.3.3 <i>PCR Cuantitativa.....</i>	<i>80</i>
4.7.3.3.A <i>Diseño de oligonucleótidos para PCR cuantitativa</i>	<i>80</i>
4.7.3.3.B <i>PCR cuantitativa a tiempo real</i>	<i>81</i>
4.7.3.3.C <i>Cuantificación y análisis de la expresión génica relativa</i>	<i>82</i>
4.7.4 <i>Estudio de proteínas por Western Blot (WB).....</i>	<i>82</i>
4.7.5 <i>Análisis por citometría de flujo.....</i>	<i>84</i>
4.7.6 <i>Extracción de ADN genómico</i>	<i>84</i>
4.7.7 <i>Evaluación de la metilación global del ADN.....</i>	<i>85</i>
4.7.8 <i>Análisis de la metilación del ADN mediante enzimas de restricción sensibles a metilación y PCR cuantitativa (MSRE-qPCR).</i>	<i>85</i>
4.8 SOLUCIONES UTILIZADAS	88
4.8.1 <i>PBS 1x.....</i>	<i>88</i>
4.8.2 <i>Técnicas de Biología Celular.....</i>	<i>88</i>
4.8.2.1 <i>Solución fijadora.....</i>	<i>88</i>
4.8.2.2 <i>Solución Ringer.....</i>	<i>88</i>
4.8.2.3 <i>Fijador Khale's.....</i>	<i>88</i>
4.8.3 <i>Técnicas de Microscopía Confocal.....</i>	<i>88</i>
4.8.3.1 <i>Inmunofluorescencia.....</i>	<i>88</i>
4.8.3.1.A <i>HEPEM 2x</i>	<i>88</i>
4.8.4 <i>Técnicas de Biología Molecular</i>	<i>89</i>
4.8.4.1 <i>Electroforesis</i>	<i>89</i>

4.8.4.1.A TBE 0,5%.....	89
4.8.4.2 Hibridación in situ	89
4.8.4.2.A Buffer de hibridación.....	89
4.8.4.2.B Solución I	89
4.8.4.2.C Solución III	89
4.8.4.2.D TBST Levamisol 2mM	89
4.8.4.2.E NTMT	90
4.8.4.3 Western Blot.....	90
4.8.4.3.A HEPES 2x	90
4.8.4.3.B Tampón de carga 2x	90
4.8.4.3.C Tampón de electroforesis.....	90
4.8.4.3.D Tampón de transferencia.....	90
4.8.4.3.E TBST	90
5. RESULTADOS	93
5.1 CARACTERIZACIÓN EPIGENÉTICA DE LAS CÉLULAS PRESENTES EN EL TEJIDO DEL ESPACIO INTERDIGITAL	105
5.1.1 <i>Expresión de los genes implicados en la metilación del ADN</i>	<i>105</i>
5.1.2 <i>Distribución nuclear de los factores epigenéticos</i>	<i>109</i>
5.1.2.1 Organización de la metilación del ADN y su relación con los mediadores de la DDR	109
5.1.2.2 Distribución celular de los UHRFs y su asociación con la metilación del ADN	113
5.2 IMPLICACIÓN DE LA METILACIÓN DEL ADN EN LA DIFERENCIACIÓN CONDRÓGENICA	115
5.2.1 <i>Análisis funcional de la expresión de Dnmt3b durante la diferenciación condrógena en cultivos celulares de progenitores esqueléticos</i>	<i>116</i>
5.2.1 <i>Análisis funcional de la expresión de Uhrf1 y Uhrf2 en la diferenciación condrógena de los progenitores esqueléticos en cultivo.....</i>	<i>119</i>
5.3 PARTICIPACIÓN DE LOS FACTORES EPIGENÉTICOS EN LA MODULACIÓN DE LA PROGRESIÓN DEL CICLO CELULAR Y LA MUERTE.....	122
5.3.1 <i>Implicación de la metilación del ADN en la progresión del ciclo celular y la muerte de los progenitores esqueléticos.</i>	<i>122</i>
5.3.2 <i>Papel de los UHRFs en la progresión del ciclo celular y la muerte del mesodermo indiferenciado de la extremidad en formación</i>	<i>124</i>
5.4 REGULACIÓN TRANSCRIPCIONAL DE LAS CASCADAS DE SEÑALIZACIÓN DE LA MUERTE CELULAR Y LA CONDRÓGENESIS	126
5.4.1. <i>Influencia transcripcional de los experimentos funcionales de Dnmt3b</i>	<i>126</i>
5.4.2 <i>Efectos, a nivel transcripcional, de la sobreexpresión y el silenciamiento de los UHRFs</i>	<i>130</i>
6. DISCUSIÓN	133
6.1 EL DAÑO EN EL ADN PRECEDE A LA APOPTOSIS DE LOS PROGENITORES ESQUELÉTICOS DEL ESPACIO INTERDIGITAL	136
6.2 REGULACIÓN EPIGENÉTICA DE LA MUERTE CELULAR PROGRAMADA Y LA CONDRÓGENESIS DURANTE EL DESARROLLO EMBRIONARIO DE LA EXTREMIDAD	137
7. CONCLUSIONES	145
8. BIBLIOGRAFÍA	149
9. ARTÍCULOS	197

ABREVIATURAS

γ-H2AX: Forma fosforilada de la histona H2AX en la serina 139

5-aza: 5-azacitidina

5-hmC: 5-hidroxi-metilcitosina

5-mC: 5-metilcitosina

53BP1: *p53 Binding protein 1*

ADN: Ácido desoxirribonucleico

ADP: Adenosin difosfato
(Adenosine diphosphate)

AER: Cresta ectodérmica apical
(*Apical Ectodermic Ridge*)

AID/APOBEC: *Activation-induced cytidine deaminase/apolipoprotein B mRNA-editing enzyme complex*

AIF: *Apoptosis-inducing Factor*

ANZ: Zona necrótica posterior
(*Anterior Necrotic Zone*)

APAF1: *Apoptotic Protease-activating factor 1*

APE1: *Apurinic/aprimidinic endonuclease 1*

ARN: Ácido rinonucleico

ATM: *Ataxia-Telangiectasia Mutated*

ATR: *ATM and Rad3 related*

ATRIP: *ATR interacting protein*

BAK: *BCL-2 homologous antagonist killer*

BAX: *BCL-2-associated X protein*

BCL-2: *B-cell lymphoma 2*

BER: Reparación por excisión de bases
(*Base Excision Repair*)

BID: *BH3-interacting domain death agonist*

BIM: *BCL-2-interacting mediator of cell death*

BMP: Proteína morfogenética de hueso
(*Bone Morphogenetic Protein*)

BRCA1: *Breast Cancer 1*

BSA: *Bovine serum albumins*

c-Cbl: *Casitas B-lineage lymphoma*

CBP: *CREB-binding Protein*

CENP-A: *Centromere protein A*

CHD: Helicasa con cromodominio de unión al ADN
(*Chromodomain-helicase-DNA binding*)

Col10a1: *Collagen type X alpha 1 chain*

CTCF: *CCCTC-Binding factor*

DD: Dominio de Muerte (*Death Domain*)

DDR: Respuesta al daño en el ADN
(*DNA Damage Response*)

DISC: *Death-inducing signaling complex*

DMEM: *Dublecco's modified eagle medium*

DNA-PKcs: *DNA Protein Kinase catalytic subunit*

DNMT: ADN metiltransferasa
(*DNA methyltransferase*)

DOT1L: *DOT1 Like histone lysine methyltransferase*

DSBs: Roturas de doble hebra
(*Double-Strand Breaks*)

EZH2: *Enhancer of zeste homolog 2*

FADD: *Fas-associated death domain*

Fas-L: *Fas Ligand*

FBS: *Foetal bovine serum*

FGF: Factor de crecimiento fibroblástico
(*Fibroblast Growth Factor*)

Gy: Gray

H1: Histona 1

H2AX: Histona H2A variante X

HAT: Histona-acetiltransferasa

HDAC: Histona-deacetilasa

HMG: *High Mobility Group*

HMGB1: *High Mobility Group Box 1 protein*

HR: Recombinación Homóloga

HTR2A: *5-Hydroxytryptamine Receptor 2A*

IAP: *Inhibitor of apoptosis proteins*

IGF1: *Insulin-like growth factor 1*

IHH: *Indian Hedgehog*

ISWI: *Imitation Switch*

IAZ: Zonas apoptóticas interdigitales
(*Interdigital apoptotic zones*)

JMJD3: *Jumonji domain containing-3*

K: Lisina

KHMT: Lisina-histona metiltransferasa

KO: *Knock-out*

lncRNA: *long non-coding RNA*

LSD1: *lysine-specific histone demethylase 1A*

MDC1: *Mediator of DNA damage Checkpoint 1*

MeCP1: *Methyl-CpG-binding domain protein 1*

MEF2: *Myocyte-specific Enhancer factor 2*
MEF2C: *Mads box transcription enhancer factor 2, polypeptide C*
miRNA: microRNA
MMP13: *Matrix metalloproteinase 13*
MRN: *Mre11-Rad50-Nbs1*
ncRNA: *non-coding RNA*
NHEJ: Unión de extremos no homólogos (*Non-homologous end joining*)
p38-MAPK: *Mitogen-activated protein kinase p38*
pb: Pares de bases
PFA: Paraformaldehído
PHD: *Plant Homeodomain*
PHF2: *PHD finger protein 2*
PIKK: *PI-3-Kinase-related-kinases*
piRNA: *Piwi interacting RNA*
PNKP: *Polynucleotide Kinase 3'-phosphatase*
PNZ: *Posterior Necrotic Zone*
PRC2: *Polycomb repressive complex 2*
PRDM2: *PR Domain Zinc Finger protein 2*
PUMA: *p53-upregulated modulator of apoptosis*
PZ: *Zona de progreso (Progress zone)*
RA: *Ácido Retinoico (Retinoic Acid)*
RFC: *Replication Factor C*
RNAi: *ARN de interferencia*
RNF8: *E3 Ubiquitin-protein ligase*
ROS: *Especies reactivas del oxígeno (Reactive Oxygen Species)*
RPA: *Replication Protein A*
RUNX2: *Run-related Transcription Factor 2*
SAHF: *Focos de heterocromatina asociados a senescencia (Senescence-Associated Heterochromatic Focus)*
SAM: *S-adenosil metionina*
SAR: *Scaffold attachment region*
SASP: *Fenotipo secretor asociado a senescencia (Senecence-Associated Secretory Phenotype)*
SETDB1: *SET domain protein bifurcated 1*

siRNA: *ARN pequeño de interferencia (small interfering RNA)*
SMAC: *Second mitochondria-derived activator of caspases*
snRNA: *small nucleolar RNA*
Sox9: *SRY-box9*
SRA: *SET and RING associated domain*
SSBs: *Roturas de ADN de cadena sencilla (Single-Strand Breaks)*
SUMO: *Small Ubiquitin-like modifier*
SUV39H1: *Suppressor of variegation 3-9 homolog 1*
SWI-SNF: *SWItch/Sucrose non-Fermentable*
TAD: *Dominio de asociación topológica (Topologically associating domain)*
TDD: *Tandem Tudor Domain*
TDG: *Thymine-DNA glycosylase*
TDP1: *Tyrosyl-DNA phosphodiesterase 1*
TET: *Ten-Eleven-Translocation dioxygenase*
TGFβ: *Transforming Growth Factor β*
TGFβRII: *TGF-β receptor type II*
TNF: *Factor de necrosis tumoral (Tumoral Necrosis Factor)*
TopBP1: *DNA Topoisomerase 2-binding protein 1*
TRADD: *TNF receptor-associated death domain*
TRAIL: *TNF-related apoptosis-inducing ligand*
TUNEL: *Terminal transferase-mediated dUTP Nick End Labeling*
UBL: *Ubiquitin-like*
VEGF: *Factor de crecimiento del endotelio vascular (Vascular endothelial growth factor)*
Wnt: *Wintless-INT*
XIAP: *X-linked inhibitor of apoptosis protein*
XLf: *XRCC4-like factor*
XRCC4: *X-ray Repair Cross-Complementing protein 4*
ZFP521: *Zinc Finger protein 521*

1. INTRODUCCIÓN

En el desarrollo embrionario, el intenso y continuo crecimiento de las estructuras que compondrán el organismo comparte espacio y tiempo con procesos de muerte celular programada encargados de darles forma. Un ejemplo paradigmático, en el que la muerte celular desempeña un papel esencial en el remodelado anatómico, es el que tiene lugar en el tejido del espacio interdigital durante la formación de los dedos de las extremidades de los vertebrados (Montero y Hurlé., 2010). La variación en la intensidad de la regresión de dicho tejido es la responsable de la existencia de una amplia diversidad morfológica en los dedos de las diferentes especies, como ocurre con los dedos palmeados de los patos o con el patagio de los murciélagos (Cordeiro et al., 2019). Aunque desde el principio se calificó a este tipo de muerte como “necrosis celular”, estudios morfológicos comparando el aspecto de las células muertas, de tejidos embrionarios y tumorales, propusieron el término de “apoptosis” para definir la muerte de células sin reacción periférica inflamatoria y con una morfología caracterizada por la condensación y fragmentación celular (Kerr et al., 1972; Lorda-Diez et al., 2015b).

La remodelación del tejido interdigital en especies con dedos libres, como el ratón o el pollo, incluye desde el punto de vista celular no solo un proceso de apoptosis masiva sino otra serie de acontecimientos, como la inhibición del crecimiento, la senescencia celular, la degradación de la matriz extracelular, la regresión y remodelación de los vasos sanguíneos o la invasión regulada de macrófagos (Toné y Tanaka., 1997; Salas-Vidal et al., 2001; Hernández-Martínez y Covarrubias., 2011; McCulloch et al., 2009; Díaz-Mendoza et al., 2014; Suda et al., 2014; Lorda-Diez et al., 2015a, b; Muñoz-Espin et al., 2013). Asimismo, durante la regresión del tejido del espacio interdigital, también se observa una intensa activación de los lisosomas con un aumento de la expresión de las catepsinas, las DNasas y del estrés oxidativo celular (Zuzarte-Luis et al., 2007; Montero et al., 2010; Covarrubias et al., 2008). Sin embargo, los numerosos estudios realizados hasta la fecha aún no han podido identificar las señales que disparan el proceso y, a pesar de que algunos autores han sugerido que diversos miembros de la ruta de señalización de la vía extrínseca de la apoptosis pueden ejercer dicha función, todavía no existen evidencias funcionales al respecto (Svandova et al., 2017).

Si bien existe una amplia bibliografía que demuestra que algunos factores de crecimiento expresados en la extremidad en formación (FGFs, BMPs, IGF1 o RA) juegan un papel decisivo en la muerte del tejido interdigital, aún se desconoce cómo la maquinaria de muerte celular se ve afectada por ellos (Merino et al., 1998; Pajni-Underwood et al., 2007; Hernández-Martínez et al., 2009; van Kleffens et al., 1999; Rodríguez-León et al., 1999). Con el paso de los años, tampoco se han conseguido aclarar las bases de actuación de las señales de muerte, aunque las caspasas (3, 6 y 7) y los factores permeabilizadores de la membrana mitocondrial parecen contribuir en el proceso (Green y Llambi., 2015; Walczak., 2013). Todos estos hechos ponen de manifiesto el desconocimiento que hoy en día existe sobre el proceso de muerte celular programada que tiene lugar en el tejido del espacio interdigital durante la formación de las extremidades; un modelo clásico de remodelado anatómico que sigue siendo un enigma. Los numerosos eventos degenerativos observados a nivel celular hacen sospechar de la existencia de señales complementarias a los efectores de muerte, capaces de iniciar el proceso de eliminación celular. Por ejemplo, se ha observado, en células madre, que la aparición de daño en su ADN desencadena un proceso de reparación caracterizado por la detención del ciclo celular acompañada de un fenotipo secretor asociado a senescencia (*Senecence-Associated Secretory Phenotype, SASP*) e incluso por apoptosis; eventos que también se observan durante la regresión del tejido interdigital (Rich et al., 2000; Lu et al., 2006; Cook et al., 2009). Del mismo modo, en células tumorales, el daño en el ADN, la senescencia celular y la apoptosis están asociados con alteraciones en la configuración de la cromatina, mediadas por mecanismos epigenéticos, capaces de determinar la tumorigénesis y sensibilidad a la quimio y/o radioterapia (Liu et al., 2017; Palla et al., 2017).

¿Ocurre lo mismo durante la formación de los dedos? ¿Es posible que la configuración de la cromatina de las células presentes en el tejido del espacio interdigital sea diferente a la que poseen las células que constituirán los dedos? ¿Juega la epigenética un papel clave en el proceso de muerte celular programada que ocurre durante la regresión interdigital? Este es el punto de partida de la presente Tesis Doctoral.

2. ESTADO ACTUAL DEL PROBLEMA

2.1 Organización del material genético

El material genético de la célula eucariota está localizado en el núcleo, donde sus más de dos metros de longitud se pliegan para constituir la unidad más pequeña de compactación de la cromatina, el nucleosoma (Kornberg., 1974; Cremer y Cremer., 2010). En él, un segmento de ADN de unas 147 pares de bases (pb) se dispone alrededor de un octámero de proteínas compuesto por dos dímeros de histonas H2A-H2B y dos de H3-H4 (McGinty y Tan., 2015) (Fig. 1). Las histonas son proteínas pequeñas que se unen al azúcar-fosfato de la cadena de ADN por una región central de plegamiento y que presentan un dominio N-terminal, rico en aminoácidos con carga positiva, conocido como cola de las histonas. Este dominio, de entre 15-130 nucleótidos, sobresale del nucleosoma y es susceptible de sufrir modificaciones postraduccionales que, de forma reversible, afectan a la estructura de la cromatina y a su función (Eslaminejad et al., 2013).

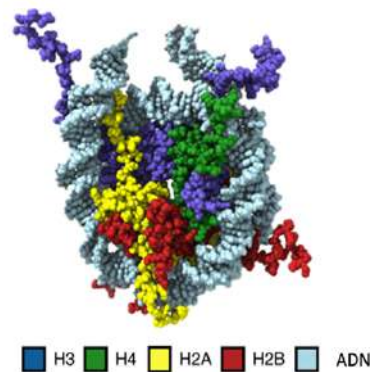


Figura 1. Estructura del nucleosoma. El nucleosoma está compuesto por un octámero de histonas alrededor del cual se enrolla la hebra de ADN; sobresaliendo de él se observan los extremos N-terminales de dichas proteínas. (Modificado de Zhou et al., 2019. doi: 10.1038/s41594-018-0166-x).

El complejo ADN-nucleosoma forma una fibra de 11nm que se asemeja a un “collar de perlas” por su característico ordenamiento lineal en zig-zag. Dicha organización, descrita por Heitz en 1928, recibe el nombre de eucromatina y se relaciona con una configuración abierta en la que el ADN presenta una mayor flexibilidad funcional y a la que la maquinaria de transcripción, replicación o reparación accede con facilidad (Li et al., 2007). Aunque en conjunto los nucleosomas son muy estables, funcionalmente son unidades muy dinámicas que se acercan y alejan entre sí gracias a la unión de determinados factores. Uno de ellos es la histona H1, una proteína que interacciona con los extremos libres del ADN del nucleosoma haciendo que éste adquiera una conformación más rígida (Fyodorov et al., 2018). La disrupción de la unión entre la histona H1 y el nucleosoma origina un cambio conformacional, transformando a la cromatina en una estructura más abierta y flexible (Felsenfeld y Groudine., 2003; Bednar et al., 2017).

Así, gracias a la histona H1, las fibras nucleosomales de 11nm se disponen de manera helicoidal para constituir una fibra cromatínica de 30nm, conocida como solenoide, compuesta por nucleosomas que al compactarse forman dominios de heterocromatina (Olins y Olins., 1974; Gerchman y Ramakrishman., 1987). Estas regiones más condensadas pueden ser ricas en secuencias repetitivas y presentar un bajo contenido en genes; es decir, ser transcripcionalmente silentes. Reciben el nombre de heterocromatina constitutiva y suelen ejercer un papel estructural manteniendo la integridad del genoma; predominan en los centrómeros, los telómeros y en grandes porciones de los cromosomas sexuales. En otras ocasiones, la heterocromatina comprende zonas del genoma cuya transcripción se ve reprimida durante un cierto momento del desarrollo o un periodo del ciclo celular, hablamos en este caso de heterocromatina facultativa (Kouzarides., 2007; Eymery et al., 2009). Lejos de ser una estructura rígida, las fibras cromatínicas de 30nm tienen una configuración dinámica y fluida que confiere al genoma mayor flexibilidad (Nishino et al., 2012; Joti et al., 2012). Estas fibras se anclan a la periferia del núcleo para formar bucles de 300 a 700nm de diámetro que se van condensando hasta formar los cromosomas; constituyendo el mayor grado de condensación del ADN (Fyodorov et al., 2018). A pesar de que durante muchos años se ha considerado la existencia de un patrón jerárquico de organización de la cromatina, en la actualidad esta idea está muy cuestionada (Dixon et al., 2016). Estudios recientes han corroborado que el ADN se organiza en fibras nucleosomales de 11nm pero no se ha podido demostrar la existencia de fibras de cromatina de 30nm (Razin y Gavrilov., 2018; Hansen et al., 2018). Por ello, se postula que dichas fibras son consecuencia de las interacciones intra e intercromosómicas de los nucleosomas y no fruto del enrollamiento de las fibras nucleosomales de 11nm (Hansen et al., 2018). Los agregados de cromatina resultantes de estas interacciones presentan territorios génicos específicos, de longitud variable, que reciben el nombre de dominios de asociación topológica (*Topologically associating domains, TADs*) (Razin et al., 2016; Nozaki et al., 2017). Estos bucles de cromatina son estructuras dinámicas que permiten el contacto entre elementos génicos alejados en el genoma; por ejemplo, entre un “*enhancer*” y su promotor (Vernimmen y Bickmore., 2015; Izzo y Schneider., 2016) (Fig. 2).

De este modo, su organización estructural y funcional favorece el dinamismo de la expresión génica, siendo capaces de formar bucles confluentes que pueden compartir complejos efectores de la transcripción (Dixon et al., 2016; Razin et al., 2016; Hansen et al., 2018). Ampliamente conservados a lo largo de la evolución, los TADs son delimitados por sitios de unión a CTCF (*11-zinc finger protein* o *CCCTC-binding factor*) y cohesinas, proteínas que participan en la formación y mantenimiento del bucle, así como en el reclutamiento de la ADN topoisomerasa II (Merkenschlager y Nora., 2016; Uusküla-Reimand et al., 2016; Hansen et al., 2018; Dixon et al., 2016; Rowley et al., 2017). El mayor grado de compactación del ADN se adquiere a nivel de los cromosomas, estructuras que ocupan un determinado volumen en el espacio nuclear y cuyo tamaño depende de la cantidad de ADN que contengan y de su estado de relajación (Fritz et al., 2019).

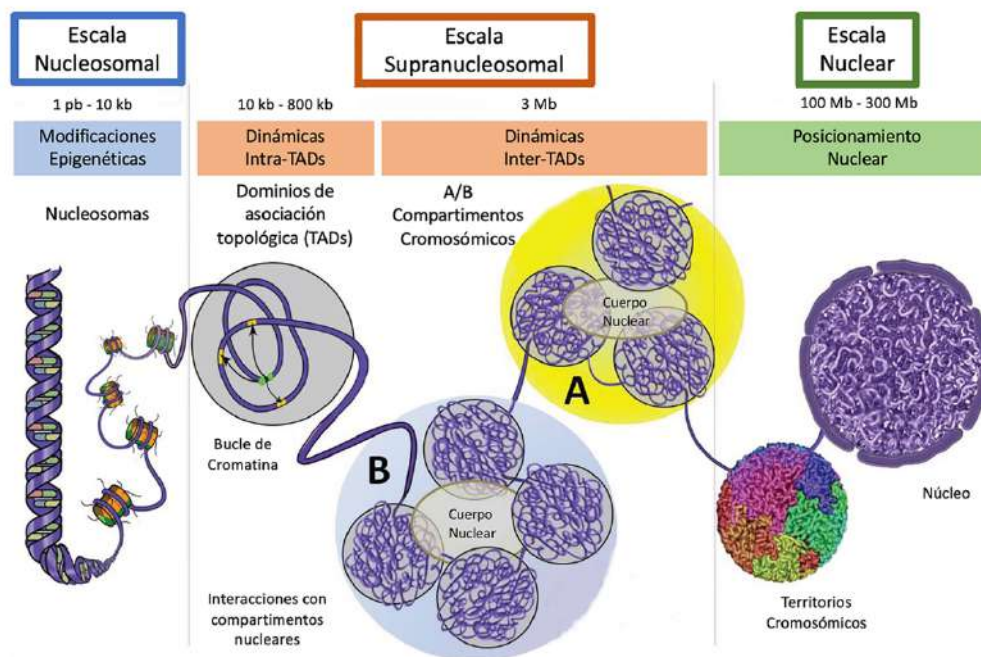


Figura 2. Representación esquemática de la organización del genoma. El ADN se dispone alrededor de un octámero de histonas para formar los nucleosomas que se organizan a modo de collar de perlas para constituir las fibras de cromatina de 11nm. En la cromatina pueden aparecer bucles que acercan zonas del genoma alejadas entre sí constituyendo dominios de asociación topológica (TADs), que pueden ser transcripcionalmente activos (A) o inactivos (B). El mayor grado de compactación del ADN se adquiere a nivel de los cromosomas, cada uno de los cuales se localiza en una determinada posición del espacio nuclear, por ello se habla de territorios cromosómicos. (Adaptado de Ea et al., 2015. doi: 10.3390/genes6030734).

2.2 Cromatina y Epigenética

Durante años se ha tratado de explicar cómo a partir de una sola célula fecundada, con un único genoma, pueden surgir los diferentes tipos celulares que constituyen el embrión y el posterior organismo adulto. Cómo teniendo el mismo libro de instrucciones, el código genético, existen tantos fenotipos y diferencias funcionales entre las diversas células que constituyen el organismo. Hoy en día, se sabe que cada tipo celular posee información adicional a ese código genético que todas las células de los distintos organismos traen de serie, una información que ha recibido el apodo de epigenética y que es esencial para el desarrollo y la diferenciación. Conrad Waddington acuñó este término en la década de los 40 para explicar cómo los genotipos daban lugar a los fenotipos y 50 años más tarde, Robin Holliday la describió como el control temporal y espacial de la actividad génica durante el desarrollo de un organismo (Waddington., 1942; Holliday., 1994). Hoy en día, la definición más extendida es la que considera a la epigenética como el estudio, en la herencia por mitosis, de los cambios en la expresión génica que ocurren sin variación en la secuencia de ADN (Russo et al., 1996).

Gracias a la epigenética, cada tipo celular es capaz de expresar un conjunto particular de genes, los cuales definen la función de dicha célula manteniendo su identidad, fenotipo y garantizando la homogeneidad tisular. Para ello, la célula cuenta con factores de transcripción específicos para cada linaje; proteínas con especificidad de secuencia capaces de reconocer y enlazarse con los promotores permitiendo la activación o represión de su expresión génica. También son necesarias las marcas epigenéticas, modificaciones que actúan, como si de símbolos de puntuación se tratase, permitiendo la interpretación de la información almacenada en el lenguaje del genoma, compuesto únicamente por cuatro letras: A, C, G y T. Así, estas modificaciones señalizan el principio y el final de un gen o un cromosoma, permiten ver la información localizada dentro de él y alteran la manera de “leer” la información. De este modo, el control epigenético regula la expresión de diversos conjuntos de genes en los distintos linajes celulares, permitiendo el desarrollo y la diferenciación a partir de una información común, el genoma.

Un ejemplo de ello ocurre durante el desarrollo embrionario, donde células muy especializadas y con características muy concretas, como son el espermatozoide y el óvulo, eliminan la mayoría de sus marcas epigenéticas (genes de impronta) al fusionarse para asegurar la totipotencia de la nueva célula que constituirá el cigoto y de la que surgirá el nuevo individuo (Reik., 2007; Cowley y Oakey., 2012). Un control epigenético aberrante puede ocasionar la muerte temprana, si se produce durante el proceso de desarrollo embrionario, o la aparición de diversos tipos de cáncer en estadios más avanzados (Zhang y Xu., 2017; Dawlaty et al., 2013; Cimmino et al., 2015).

2.2.1 Modificaciones epigenéticas de la cromatina

Debido al importante papel que juega la estructura de la cromatina en la regulación de procesos tan esenciales como la transcripción, la replicación o la reparación del ADN; la célula ha desarrollado mecanismos para modificar de forma espacial y temporal su organización (Li et al., 2007; Khorasanizadeh., 2004). Estas alteraciones reciben el nombre de modificaciones epigenéticas y son cambios heredables en la función o actividad de los genes que no son consecuencia de una variación en su secuencia nucleotídica (Jadotte., 2018; Ling y Groop., 2009). Influyen en la regulación de la estabilidad cromosómica y genómica, en el silenciamiento transcripcional de genes, en la impronta génica, la regulación de elementos móviles transponibles, la inactivación del cromosoma X y en el establecimiento y mantenimiento de la identidad celular (Bhutani et al., 2011).

Entre los principales mecanismos epigenéticos destacan la metilación del ADN, las modificaciones postraduccionales de las histonas, el remodelado de la cromatina y la regulación génica mediada por los RNAs no codificantes (Saha., 2006; Gluckman et al., 2011; Maresca., 2015) (Figura 3). Todos ellos están involucrados en la regulación de diversos procesos de la célula y en su respuesta a cambios en el entorno extra e intracelular, repercutiendo en mayor o menor medida en el desarrollo del organismo (Goldberg et al., 2007).

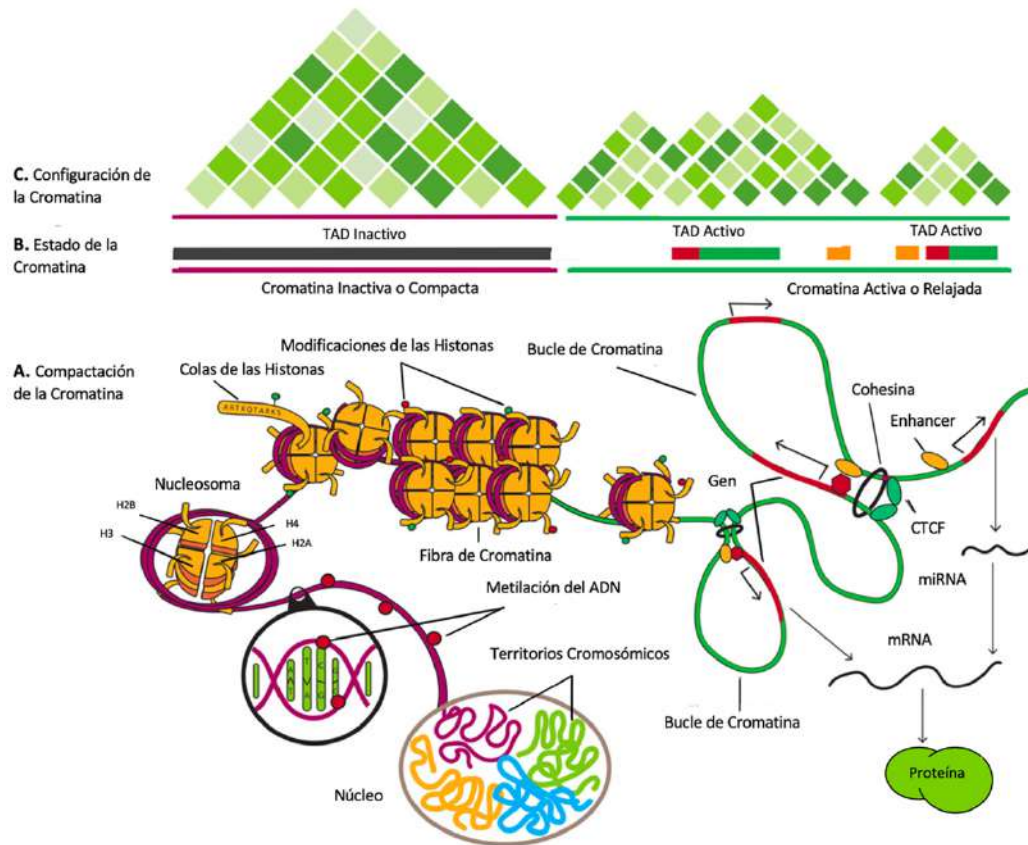


Figura 3. Papel de la epigenética en la regulación de la conformación de la cromatina y la transcripción. La metilación en el ADN y las modificaciones postraduccionales en los extremos N-terminales de las colas de las histonas son dos mecanismos epigenéticos capaces de regular la expresión génica. Para ello, remodelan el estado de compactación de la cromatina haciéndola más o menos accesible para las proteínas encargadas de la transcripción. La formación de bucles de cromatina, gracias a la interacción de las proteínas cohesina y CTCF, permite acercar zonas del genoma alejadas entre sí constituyendo dominios de asociación topológica (TADs). (Adaptado de van Meurs et al., 2019. doi:10.1002/jbmr.3662).

2.2.1.1 Metilación del ADN

La metilación del ADN consiste en la unión covalente de un grupo metilo, procedente de la S-adenosilmetionina (SAM) al carbono 5' de la citosina, una de las bases nitrogenadas que componen dicho ácido nucleico; convirtiéndola en 5-metilcitosina (5-mC) (Hervouet et al., 2018). Normalmente, esta modificación epigenética ocurre en aquellas citosinas que preceden a una guanina, constituyendo los conocidos dinucleótidos CpG (Eslaminejad et al., 2013).

La razón principal por la cual dicha modificación se dispone en estos dinucleótidos radica en que, en el conjunto de la doble hebra, ambas bases forman una zona simétrica de fácil mantenimiento en la división celular, rasgo distintivo de las modificaciones epigenéticas.

La conversión de la citosina en 5-mC está catalizada por las ADN metiltransferasas (*DNA methyltransferases, DNMTs*), enzimas encargados de establecer y mantener los patrones de metilación en el ADN (Patel et al., 2013; Chen et al., 2013). Hasta la fecha, han sido descritas tres DNMTs con actividad catalítica y, aunque todas ellas comparten una estructura similar, con un dominio catalítico en el extremo C-terminal y uno regulador en el N-terminal, presentan funciones y patrones de expresión únicos (Xie et al., 1999; Hervouet et al., 2018). La DNMT1, conocida como DNMT de mantenimiento, reconoce el ADN hemimetilado; es decir, aquel que solo presenta una de las dos cadenas metiladas (Negishi et al., 2009). Actúa, principalmente, durante la replicación copiando los patrones originales de metilación de la hebra de ADN a la hebra hija recién sintetizada (Bhutani et al., 2011). Este enzima, juega un papel crítico en las células en división, durante la diferenciación celular y también participa en la reparación de la metilación del ADN (Mortusewicz et al., 2005). Por su parte, las DNMT3A y DNMT3B llevan a cabo la metilación *de novo*, es decir, establecen nuevos patrones de metilación en zonas de ADN no modificado. Si bien son similares en estructura y función, la diferencia entre ambas radica en el patrón de expresión de sus genes. Altamente expresadas en el desarrollo embrionario, su expresión se reduce notablemente durante la diferenciación celular (Bird., 2002; Cowley y Oakey., 2012; Hervouet et al., 2018). Mientras que DNMT3A es de expresión ubicua, DNMT3B no suele expresarse en los tejidos diferenciados a excepción de la médula ósea, la glándula tiroides y los testículos (Xie et al., 1999). La drástica reducción de los niveles de las DNMTs tras la diferenciación sugiere que el patrón de metilación del ADN en células postmitóticas es relativamente estable (Feng et al., 2005). La DNMT3L es otro miembro de la familia de las DNMTs que se expresa durante el desarrollo embrionario temprano y cuya actuación en la etapa adulta queda relegada al timo y a las células germinales (Aapola et al., 2001). Carece de dominio catalítico y por ello se asocia con las DNMT3A y DNMT3B para desempeñar su actividad metiltransferasa (Jia et al., 2007). Este enzima participa en el “*imprinting*” genómico, en la metilación de los retrotransposones y en la compactación del cromosoma X (La Salle et al., 2004; Zamudio et al., 2011).

Aunque durante años se ha mantenido la idea de que las DNMT3A y DNMT3B son las encargadas de la metilación *de novo*, evidencias recientes sugieren que también intervienen en el mantenimiento de los patrones de metilación en células madre embrionarias y somáticas (Li et al., 2015; Liao et al., 2015). Por ello, se considera que, en mamíferos, la herencia de los patrones de metilación del ADN requiere la acción coordinada de DNMT1, DNMT3A y DNMT3B (Jones y Liang., 2009). A pesar de que las DNMTs *de novo* presentan un dominio de unión al ADN, aún no se sabe con claridad cómo son capaces de reconocer regiones génicas concretas (Ge et al., 2004). Una de las hipótesis que se postulan es que los RNAs de interferencia (RNAi) podrían actuar sobre las DNMTs para silenciar secuencias específicas de ADN (Morris et al., 2004a). Otra, considera que los factores de transcripción podrían regular la metilación *de novo* del ADN al unirse a regiones concretas de la hebra para reclutar a las DNMTs (Brenner et al., 2005; Hervouet et al., 2009). Lienert y colaboradores sugieren, en su artículo de 2011, que la unión de los factores de transcripción a islas CpG podría ser una forma de protección frente a las DNMTs *de novo*, quienes metilarían todas aquellas zonas del genoma a las que no estuviesen unidos dichos factores (Lienert et al., 2011).

Existen ciertos momentos en el desarrollo de un organismo en el que la metilación de su ADN debe eliminarse, un paso crítico e imprescindible para una correcta función celular. Un hecho curioso al respecto es que no se conoce la existencia de enzimas que, por sí mismos, sean capaces de retirar el grupo metilo de la 5-mC. Por ello, la desmetilación puede ocurrir de forma pasiva, como consecuencia de una alteración en el funcionamiento de las DNMT1 durante la división celular, o de forma activa gracias a reacciones de oxidación y/o deaminación de la 5-mC (Zhang et al., 2007). Los miembros de la familia enzimática TET (*Ten-eleven Translocation*), TET1, TET2 y TET3; presentan un dominio catalítico dioxigenasa capaz de oxidar a la 5-mC para transformarla en 5-hidroximetilcitosina (5-hmC) (Rasmussen y Helin., 2016). La adición de un grupo hidroxilo a la 5-mC consigue revertir la modificación al estadio inicial mediante dos mecanismos diferentes. El primero de ellos implica la conversión de la 5-hmC en 5'-formilcitosina y 5-carboxicitosina (Ito et al., 2010); mientras que el segundo transforma a la 5-hmC en 5-hidroximetiluracilo (Guo et al., 2011b). En mamíferos, la hidroxilación de la 5-mC puede regular la expresión génica dificultando la adhesión de proteínas de unión al ADN metilado con carácter represor como MeCP2 (*Methyl-CpG-binding Protein 2*) (Valinluck et al., 2004).

Por otra parte, la deaminación de la 5-mC está mediada por la acción de AID/APOBEC (*Activation-induced cytidine Deaminase/Apolipoprotein B mRNA-editing Enzyme Complex*), un complejo enzimático encargado de convertir la citosina modificada en timina (T). De este modo, se genera un fallo en la complementariedad entre los nucleótidos guanina (G), pareja de la citosina inicial sin modificar, y T, fruto de la deaminación de la citosina metilada (Rai et al., 2008). Esta base, se convierte así en un blanco para el mecanismo de reparación del ADN por escisión de bases (*Base Excision Repair, BER*), quien gracias a la acción de la timina ADN glicosilasa (*Thymine-DNA glycosylase, TDG*) retira el residuo modificado y lo reemplaza por una citosina (Bhutani et al., 2011; He et al., 2011). La inactivación de este enzima en embriones de ratón produce la hipermetilación de genes, como el del factor de crecimiento insulínico tipo II (*Insulin Like Growth Factor 2, Igf2*); este hecho hace suponer que TDG tiene un papel protector frente a la metilación *de novo* de genes implicados en el “*imprinting*” (Cortellino et al., 2011). Los patrones de metilación presentes en el genoma no son más que el resultado de la competición y el equilibrio existente entre las DNMTs y TETs. Sin embargo, ambas proteínas pueden interaccionar para regular la unión de un factor de transcripción al ADN como se ha observado en células madre epidérmicas humanas (Rinaldi et al., 2016). Los análisis de metilación llevados a cabo en ratones “*knock-out*” (KO) para DNMT3A y TET2 sugieren que ambas moléculas actúan de manera sinérgica a pesar de tener funciones antagónicas (Zhang et al., 2016).

Aunque se encuentran distribuidos a lo largo de todo el genoma, los dinucleótidos CpG se concentran formando islas, llamadas islas CpG, en el 50% de las regiones cercanas al sitio de inicio de la transcripción (Jones., 2012; Maresca., 2015). El hecho de que aproximadamente el 70% de los promotores génicos presente islas CpG pone de manifiesto su importancia funcional, al promover la expresión génica mediante la regulación de la conformación de la cromatina y la unión de los factores de transcripción (Saxonov et al., 2006; Mikkelsen et al., 2007). Como cabe suponer, estas zonas deben ser accesibles para favorecer el acoplamiento de los factores de transcripción y por ello no suelen estar metiladas, pues dicha marca epigenética está asociada con la condensación de la cromatina.

Cuando esto ocurre, puede producirse la unión de proteínas capaces de reconocer la metilación de los dinucleótidos CpG, como MeCP1 (*Methyl-CpG-binding protein 1*) y MeCP2 (*Methyl-CpG-binding protein 2*), quienes, gracias a su dominio de represión transcripcional, silencian la expresión del gen (Mohn et al., 2008; Kimura y Shiota., 2003).

En otras ocasiones, la presencia de un dinucleótido CpG metilado en la secuencia específica de reconocimiento de un factor de transcripción puede bloquear su unión ocasionando la inactivación del gen, como ocurre en el caso de SP1 (Blattler y Farnham., 2013). La metilación del ADN es una modificación epigenética dinámica que cambia los patrones de silenciamiento de los genes en momentos particulares de la vida del individuo. Estas pautas de metilación se establecen en las células germinales y durante la preimplantación embrionaria, siendo esenciales para el correcto desarrollo del organismo (Volkmar et al., 2012; Chen et al., 2013). Puede decirse así que los niveles y patrones de metilación son específicos de tejido; característica que distingue los estados de actividad génica entre células diferenciadas (Jones., 2012). Uno de los acontecimientos más estudiados al respecto es la inactivación del cromosoma X, paterno o materno, en las hembras de los mamíferos. Este proceso, que ocurre de manera aleatoria durante el desarrollo embrionario, conlleva la metilación de las islas CpG de los genes presentes en ese cromosoma; una decisión que será heredada por las células hijas tras la mitosis (Cotton et al., 2015). Esta modificación epigenética interviene también en otros eventos importantes para el organismo como la impronta genómica, el silenciamiento de elementos móviles y el mantenimiento de la identidad e integridad celular (Bhutani et al., 2011; Denis et al., 2011). Localizada con frecuencia en las regiones intergénicas, la metilación del ADN previene al genoma de deleciones, inserciones, duplicaciones o translocaciones cromosómicas que pueden comprometer su estabilidad. De igual forma, es posible encontrarla en los elementos repetitivos, más concretamente en los transposones, bloqueando su expresión y efecto mutagénico (Schulz., 2006). Desde el punto de vista evolutivo, se considera que la principal función de la metilación del ADN es la defensa del genoma (Bestor., 2003). De este modo, la metilación de los promotores de los genes que codifican las proteínas necesarias para la transposición de estos elementos repetitivos silencia su transcripción, impidiendo que se inserten en otras zonas del genoma.

Sin embargo, no debemos olvidar que la metilación del ADN puede desencadenar un evento mutagénico, promovido por la conversión de la 5-mC en una timina, que conduce a la alteración de la secuencia nucleotídica del gen e interfiere en su reconocimiento mediado por los FT (Bestor et al., 2015).

Un apunte para destacar a la hora de describir la metilación del ADN es el papel que dicha marca epigenética juega en una patología tan extendida como es el cáncer. Bajo esta circunstancia se producen cambios globales en los patrones de metilación, observándose por regla general una hipometilación del genoma (O'Donnell et al., 2014; Ehrlich., 2009). Los elementos repetitivos y las regiones intergénicas pierden sus marcas de represión mientras que en algunos casos particulares determinadas islas CpG se metilan. Se propaga así, por el genoma, una situación de inestabilidad que favorece el aumento de las deleciones, inserciones, translocaciones, duplicaciones o incluso la pérdida de alguna porción cromosómica (Jung et al., 2008; Nishida et al., 2013).

2.2.1.2 Modificaciones postraduccionales de las histonas

Como se ha mencionado con anterioridad, las colas de las histonas son claves en la regulación de la accesibilidad al ADN del nucleosoma; de modo que las modificaciones postraduccionales reversibles que sufren son consideradas señales epigenéticas que participan en la expresión diferencial específica de cada célula; es lo que se conoce como “código de las histonas” (Maresca., 2015; Shahid et al., 2019). Entre estas modificaciones se incluyen metilación, acetilación, fosforilación, ribosilación de ADP, ubiquitinación, desaminación, isomerización, sumoilación, butirilación y propionilación (Kebede et al., 2015). La amplia variedad de alteraciones y la posibilidad de combinación entre ellas, proporciona a la célula un importante potencial de respuestas funcionales ante los distintos estímulos a los que se enfrenta (Li et al., 2007). De todas las modificaciones postraduccionales comentadas, la acetilación y la metilación son las mejor caracterizadas como reguladores epigenéticos y se ha visto que están implicadas en la transcripción génica (Eslaminejad et al., 2013; Li et al., 2007).

2.2.1.2.A Acetilación de las colas de las histonas

Asociada con la actividad transcripcional, la adición de un grupo acetilo a un residuo aminoacídico, generalmente lisina (K), de la cola de las histonas H3 y H4 neutraliza parte de su carga positiva haciendo que pierda su atracción por el ADN. Así, la cromatina adquiere una configuración más laxa y es más accesible para la maquinaria de transcripción (Eslaminejad et al., 2013). Cabe destacar que la acetilación de las colas de las histonas puede ser reconocida por proteínas que presentan bromodominios, capaces de ocasionar cambios por ellas mismas o de reclutar a otros factores (Zeng et al., 2010). Esta modificación postraducciona es llevada a cabo por las histona acetiltransferasas (*Histone acetyltransferase, HATs*), enzimas que añaden a los residuos de lisina un grupo acetilo procedente de una molécula de acetil-CoA, formando el residuo aminoacídico ϵ -N-acetil lisina. Dicha familia proteica está constituida por un amplio grupo de complejos con múltiples subunidades (Bolden et al., 2006; Li et al., 2007). Por el contrario, la eliminación del grupo acetilo está mediada por las histonas deacetilasas (*Histone deacetylases, HDACs*), quienes incrementan la carga positiva de las histonas y su afinidad por el ADN tras ser reclutadas por factores de transcripción específicos de secuencia. Dicho aumento conduce a una compactación de la cromatina y a un bloqueo de la transcripción (Eckschlager et al., 2017). Existen cuatro clases diferentes de HDACs:

- **HDACs de clase I:** su expresión es ubicua y comprende a HDAC1, HDAC2, HDAC3 y HDAC8.
- **HDACs de clase II:** presentan una expresión más restringida y los enzimas pertenecientes a ella son capaces de entrar y salir del núcleo. Este grupo está compuesto por HDAC4, HDAC5, HDAC6, HDAC7, HDAC9 y HDAC10.
- **HDACs de clase III:** proteínas dependientes de NAD^+ entre las que destacan las Sirtuinas, de la 1 a la 7 (Eslaminejad et al., 2013).
- **HDACs de clase IV:** difieren enormemente del resto de HDACs, aunque son capaces de reconocer secuencias de ADN similares a las identificadas por miembros de otras clases; a este grupo pertenece HDAC11 (Tang et al., 2013).

Las HDACs de las clases I, II y IV requieren Zn^{2+} para retirar los grupos acetilo de las proteínas sobre las que actúan mientras que las de clase III dependen de NAD^+ (Trapp y Jung., 2006).

En mamíferos, estas HDACs presentan un dominio deacetilasa conservado y los fenotipos observados en los animales *knock-out* (KO) para alguno de estos enzimas apuntan a una alta especificidad funcional (Haberland et al., 2009). Un ejemplo de ello es la deficiencia en sirtuina 1, responsable de la pérdida global de las marcas típicas de la heterocromatina constitutiva así como de alteraciones en el metabolismo, el envejecimiento o la síntesis de RNA ribosómicos (Kim y Um., 2008). El patrón de acetilación de los residuos de las colas de las histonas experimenta cambios durante el ciclo circadiano y no es un fenómeno heredable por mitosis, de ahí que sea considerada como una modificación de la cromatina y no como una marca epigenética (Aguilar-Arnal y Sassone-Corsi., 2015).

2.2.1.2.B Metilación de las colas de las histonas

La metilación de los residuos de las histonas es una modificación postraduccional muy conservada y extendida por las regiones de heterocromatina que juega un papel esencial en la modulación de las rutas de señalización (Greer y Shi., 2012). La incorporación y eliminación de uno o varios grupos metilo a los residuos de los extremos N-terminales de las histonas está catalizada por enzimas específicos que se agrupan en varias clases en función del residuo aminoacídico sobre el que actúan (Bannister y Kouzarides., 2005; Eslaminejad et al., 2013). Las histona metiltransferasas específicas de lisina (*Lysine Histone methyltransferase, KHMTs*) pueden presentar un dominio catalítico SET y están implicadas en la represión y activación transcripcional. Son responsables de la metilación de la histona H3 en las lisinas 4, 9, 27, 36, 79 y de la histona H4 en la lisina 20 (Fig. 4). Más compleja que la acetilación, la metilación de las colas de las histonas puede asociarse con activación y represión transcripcional. Por ejemplo, la metilación de la lisina 4 de la histona H3 (H3K4me3) suele localizarse cerca del promotor de los genes activos, donde promueve la separación de los nucleosomas y el reclutamiento de las HAT (Pray-Grant et al., 2005; Santos-Rosa et al., 2003). Por otra parte, la trimetilación en la lisina 9 de la misma histona (H3K9me3) es una marca asociada con la heterocromatina constitutiva ubicada en los centrómeros y telómeros, áreas de cromatina silente con represión transcripcional (Pray-Grant et al., 2005; Kouzarides., 2007; Torres y Fujimori., 2015).

Los residuos metilados de los extremos N-terminales de las histonas actúan como lugares de reconocimiento a los que se pueden acoplar infinidad de proteínas, como aquellas que presentan dominios PHD (*Plant Homeodomain domain*) o Tudor, con el fin de alterar el empaquetamiento de la cromatina o de reclutar a otros factores encargados de dicha función.

Así, HP1 (*Heterochromatin protein 1*) es capaz de unirse a la H3K9me3 para reclutar a la histona-metiltransferasa SUV39 y a la DNMT1 con el objetivo de propagar la metilación (Al-Sady et al., 2013). A dicha región, también puede acoplarse una HDAC, quien, al retirar los grupos acetilo de las lisinas induce la compactación de la cromatina imponiendo un estado epigenético silenciado (Zeng et al., 2010). Estas modificaciones postraduccionales en las colas de las histonas son marcas dinámicas que cambian rápidamente en respuesta a estímulos como la diferenciación celular. Durante este proceso, es frecuente observar en las secuencias génicas de inicio de la transcripción (*Transcription Start Site, TSS*) marcas epigenéticas bivalentes, de activación y represión transcripcional (Li et al., 2007; Eslaminejad et al., 2013). En relación con esta idea y con el fin de mantener su pluripotencia, las células madre embrionarias presentan un balance entre H3K4me3 y H3K27me3, o lo que es lo mismo entre activación y represión génica (Grandy et al., 2015). Es importante mencionar que dichas marcas no se producen en la misma histona, lo cual pone de manifiesto la existencia de una distribución asimétrica de las modificaciones en el nucleosoma (Voigt et al., 2012). Al igual que ocurre con la metilación del ADN, la metilación de las colas de las histonas puede ser heredable por mitosis. Aunque este mecanismo no se conoce en detalle, se ha visto que PRC2 (*Polycomb Repressive Complex 2*) es capaz de reconocer la metilación de la lisina 27 de la histona H3 presente en los nucleosomas parentales durante la replicación del ADN y de disponer dicha marca sobre las histonas recién formadas (Tsai et al., 2010).

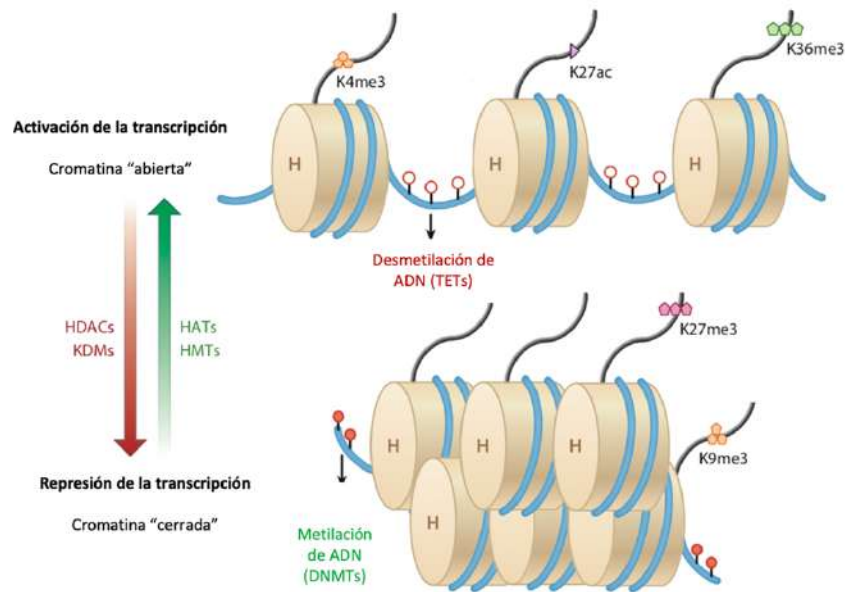


Figura 4. Repercusión de las modificaciones epigenéticas en la transcripción. El espaciado de los cromosomas es característico de las zonas de eucromatina, la hipometilación del ADN junto con la presencia de algunas modificaciones postraduccionales de los residuos de las colas de la histona H3 (representada en la figura como H) contribuyen a una activa transcripción. La metilación del ADN y de algunos residuos de los extremos N-terminal de la H3, como H3K27me3 o H3K9me3, conducen a la compactación de la cromatina y al silenciamiento de la expresión génica. (Modificado de Chen et al., 2017. doi: 10.1146/annurev-bioeng-071516-044720).

2.2.1.3 Remodeladores de la cromatina

2.2.1.3.A Complejos Remodeladores de la cromatina

Las marcas epigenéticas mencionadas hasta el momento, la metilación del ADN y las modificaciones postraduccionales de las histonas, podrían describirse o entenderse como meras señales. Etiquetas localizadas en puntos exactos del genoma que han de ser reconocidas por los encargados de uno de los procesos más complejos que tienen lugar en el núcleo celular, la alteración del plegamiento de la hebra de ADN. La remodelación de la cromatina es un mecanismo transitorio cuyo objetivo es hacer accesible la doble hebra de ADN para los factores de transcripción, separándola de su octámero de histonas (Saha., 2006; Phillips y Shaw., 2008). De este modo, los complejos remodeladores de la cromatina agrupan o dispersan los nucleosomas, alterando las interacciones electrostáticas entre el ADN y las histonas gracias a su actividad ATPasa, dependiendo de los requerimientos de la célula (Clapier y Cairns., 2009).

Contribuyen, en ocasiones, a la total eliminación de los nucleosomas presentes en el sitio de inicio de la transcripción, localizado cerca del promotor del gen; un lugar donde el ADN debe ser accesible a los factores de transcripción (Längst y Manelyte., 2015). Estos complejos son capaces de reconocer diferentes modificaciones postraduccionales en las colas de las histonas, secuencias de ADN o estructuras de ARN concretas que los guiarán hasta la región específica del genoma sobre la que actuarán. Para ello cuentan con unos dominios de “lectura”, dispuestos a ambos lados de su dominio ATPasa; en base a ellos los complejos remodeladores de la cromatina se clasifican en cuatro grupos (Clapier y Cairns., 2009).

- **Complejos de la familia SWI-SNF (*SWitch/Sacarosa No Fermentable*):** reconocen histonas acetiladas gracias al bromodominio que poseen en su extremo C-terminal. Son capaces de desalojar los nucleosomas del ADN presente en regiones transcripcionalmente activas (St Pierre y Kadoch., 2017).
- **Complejos de la familia ISWI (*Imitation SWitch*):** contienen dos dominios, SANT y SLIDE (*SANT-like ISWI*), gracias a los cuales reconocen los residuos no modificados de las colas de la histona H4 y se unen al ADN. Promueven el ensamblaje y condensación de la cromatina induciendo una represión transcripcional (Clapier y Cairns., 2009).
- **Complejos de la familia CHD (*Chromodomain-Helicase-DNA binding*):** poseen dos cromodominios en el extremo N-terminal que les permiten reconocer las colas metiladas de las histonas y tienen un dominio helicasa que contribuye a desenrollar el ADN. Al igual que los miembros de la familia anterior, parecen estar implicados en procesos de represión de la transcripción (Murawska y Brehm., 2011).
- **Complejos de la familia INO80 (*Inositol requiring 80*):** presentan una inserción en el dominio ATPasa y participan en la propagación de la variante de la histona H3, CENP-A (*Centromere protein A*), por el centrómero (Choi et al., 2017).

Entre las funciones de estos remodeladores destaca su contribución en la incorporación al nucleosoma, tras la replicación, de las variantes de las histonas. Las diferentes propiedades que les otorgan estas variaciones permiten modificar el estado del nucleosoma aumentando o disminuyendo su accesibilidad y estabilidad (Längst y Manelyte., 2015).

Algunas variantes de las histonas están implicadas en funciones estructurales, como ocurre en el caso de CENP-A, variante de la histona H3, localizada en la constricción central del cromosoma; el centrómero. Otras, como la histona macroH2A, se asocian con el cromosoma X inactivado y son características de su cromatina facultativa. Los complejos remodeladores de la cromatina están involucrados, además, en la modificación de la H2AX, variante de la histona H2A. La fosforilación de uno de los residuos de su extremo C-terminal, tras la ruptura de la doble cadena de ADN, recluta a diversos factores como el complejo INO80 y activa una respuesta de reparación frente al daño (Morrison et al., 2004).

La accesibilidad del ADN mediada por la acción de los remodeladores de la cromatina es un proceso muy complejo y esencial para la viabilidad del organismo al permitir una rápida activación o silenciamiento de la expresión génica. Así, experimentos con ratones KO donde se han eliminado estas proteínas muestran una diferenciación celular aberrante, de ahí que se postule la idea de que pueden jugar un papel clave en este proceso (De la Serna et al., 2006; Panamarova et al., 2016). También se ha observado que la mutación de algunos complejos remodeladores de la cromatina es una de las características más frecuentes en varios tipos de cáncer (Längst y Manelyte., 2015; St Pierre y Kadoch., 2017).

2.2.1.3.B *Proteínas de alta movilidad*

La arquitectura de la cromatina también puede ser modulada por las proteínas de alta movilidad (*High Mobility Group, HMG*), moléculas que intervienen en el desarrollo embrionario, la regulación de la transcripción y de la reparación del ADN (Gerlitz et al., 2009). Todas las proteínas HMG tienen propiedades bioquímicas y biofísicas similares que hacen que por sí solas, ninguna de ellas sea esencial para la viabilidad celular. Se agrupan en tres familias, HMGA, HMGB y HMGN, en función de su motivo de unión al ADN, de los cambios que son capaces de inducir y de los procesos celulares en los que participan (Bianchi y Agresti., 2005).

La subfamilia proteica HMGA se caracteriza por adquirir una estructura secundaria tras unirse a un sustrato específico, como puede ser el ADN (Huth et al., 1997; Reeves., 2003).

Coordina la formación de un complejo proteína-ADN, conocido como “*enhanceosoma*”, sobre las regiones promotoras de determinados genes durante su proceso de activación transcripcional (Merika y Thanos., 2001). Las proteínas HMGA colocalizan con la histona H1 y la topoisomerasa II en regiones conocidas como SARs (*Scaffold attachment regions*), ricas en nucleótidos A-T (Zhao et al., 1993). Estas zonas constituyen el esqueleto del cromosoma en metafase y están involucradas en la regulación dinámica de amplios dominios de cromatina, así como en la actividad transcripcional de los genes que las componen (Strick y Laemmli., 1995). Otro de los procesos biológicos en los que las proteínas HMGA alteran la estructura de la cromatina es el de apoptosis. Durante las etapas iniciales de dicho proceso de muerte celular, las proteínas HMGA se fosforilan, hecho que reduce su afinidad por el ADN y otorga a la cromatina un aspecto más laxo y, por consiguiente, más accesible para las endonucleasas (Diana et al., 2001).

Las proteínas de la familia HMGB presentan dos regiones de unión al ADN seguidas de una cola de 30 residuos aminoacídicos que reciben el nombre de caja HMG (*HMG box domains*) (Thomas y Travers., 2001). Estas proteínas participan en diversos procesos nucleares como la replicación, la reparación del ADN o la transcripción (Bianchi y Agresti., 2005). Son capaces de unirse a los nucleosomas y de facilitar el reclutamiento de determinados complejos remodeladores de la cromatina promoviendo la descompactación y favoreciendo la exposición de la hebra de ADN (Bonaldi et al., 2002). En otras ocasiones, pueden actuar como represores inhibiendo el ensamblaje de los complejos iniciadores de la transcripción a los promotores génicos (Das y Scovell., 2001). Las proteínas pertenecientes a la familia HMGB están involucradas en la organización y mantenimiento de las regiones de heterocromatina, hecho que se pone de manifiesto durante la apoptosis (Scaffidi et al., 2002).

La mayoría de los miembros de la familia HMGN se encuentra solo en vertebrados y sus niveles de expresión se correlacionan inversamente con el grado de diferenciación celular (Bustin., 2001). De este modo durante el desarrollo embrionario HMGN1 modula la expresión de SOX9, un FT clave en la diferenciación condrogénica (Furusawa et al., 2006). Capaces de competir con la H1 por los sitios de unión a la cromatina, las proteínas HMGN pueden alterar las modificaciones postraduccionales de los residuos de las colas de las histonas e inducir cambios estructurales en los nucleosomas (Lim et al., 2004; Ueda et al., 2006; Deng et al., 2017).

Para ello, se disponen entre el ADN y la zona central del octámero de histonas; en esta interacción también intervienen los extremos N-terminales de las histonas H2B y H3 (Bustin., 2001). Asimismo, los miembros de esta familia proteica pueden sufrir modificaciones postraduccionales que interfieren en su función y en su unión a la cromatina (Zhang y Wang., 2008). La acetilación de las proteínas HMGN reduce la compactación de la cromatina y su fosforilación disminuye su interacción con los nucleosomas (Lim et al., 2004).

2.2.1.3.C UHRFs

Los UHRFs (*Ubiquitin-like containing plant homeodomain (PHD) and really interesting new gene (RING) finger domain*) son proteínas de unión al ADN capaces de reprimir la transcripción mediante la modificación de la cromatina (Hashimoto et al; 2008). En los últimos años, la ubiquitin ligasa E3 UHRF1 (*Ubiquitin-like containing PHD and RING finger domain 1*) se ha postulado como un regulador epigenético esencial en el mantenimiento de la metilación del ADN durante la replicación (Bostick et al., 2007). Dicha función depende de su habilidad para unirse a la cromatina, donde facilita la ubiquitinación de las lisinas 18 y 23 de la histona H3, sitios de acoplamiento de la DNMT1 (Ishiyama et al., 2017; Nishiyama et al., 2013). Para ello, cuenta con tres regiones de unión: el dominio SRA (*SET and RING-associated*) reconoce a las 5-mCs presentes en los dinucleótidos CpG hemimetilados de doble cadena, el dominio PHD permite su unión al extremo N-terminal no modificado de la histona H3 y el dominio TDD (*Tandem Tudor Domain*) identifica la di- y trimetilación de la lisina 9 de la histona H3 (Hashimoto et al., 2008; Lallous et al., 2011; Arita et al., 2012). La unión de UHRF1 a la hebra hemimetilada induce su actividad ubiquitin ligasa, la cual será ejercida sobre los residuos aminoacídicos de la cola de la histona H3 (Fang et al., 2016; Harrison et al., 2016).

La familia proteica de los UHRFs está compuesta por otro miembro, UHRF2; una ubiquitin ligasa capaz de modificar postraduccionamente las proteínas mediante la adición de una proteína SUMO (*Small ubiquitin-related modifier*) (Oh y Chung., 2013). A pesar de presentar una alta homología de secuencia y estructura con UHRF1, UHRF2 no parece actuar de la misma manera (Zhang et al., 2011) (Fig. 5).

Este hecho se pone de manifiesto tras observar, en células madre embrionarias de ratones KO para *Uhrf1*, una reducción en los niveles de 5-mC que no es contrarrestada a pesar de la expresión de *Uhrf2* (Park et al., 2015). No se conoce a ciencia cierta el motivo por el cual UHRF2 no participa en el mantenimiento de la metilación del ADN, pero se postula que su incapacidad para reclutar a DNMT1 o para ubiquitilar a los residuos de las colas de la histona H3 pueden tener algo que ver (Vaughan et al., 2018; Zhang et al., 2011). Sin embargo, recientemente se ha atribuido al dominio SRA de UHRF2 la capacidad de reconocer y mantener los niveles de 5-hmC (Zhou et al., 2014; Chen et al., 2017).

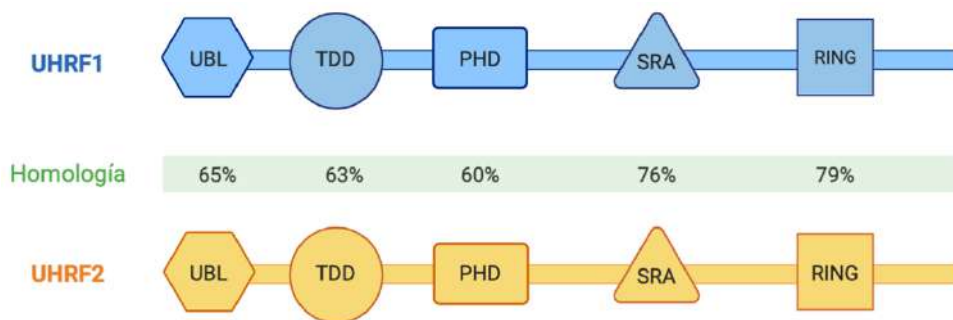


Figura 5. Representación de los dominios y del grado de homología entre UHRF1 y UHRF2. UBL (Ubiquitin-like), TTD (Tandem Tudor Domain), PHD (Plant Homeo Domain), SRA (SET and RING associated) y RING (Really Interesting New Gene domain) son los cinco dominios estructurales que constituyen estas proteínas. (Modificado de Patnaik et al., 2018. doi: 10.18632/oncotarget.25425).

Asociadas con el daño al ADN, UHRF1 y UHRF2 participan en la regulación de la proliferación y la supervivencia celular en numerosos tipos de cáncer, donde sus genes suelen estar altamente sobreexpresados y pueden comportarse tanto como oncogenes o supresores tumorales (Bronner et al., 2007; Xue et al., 2019). Si bien su papel durante el desarrollo embrionario no ha sido tan estudiado, los animales deficientes en *Uhrf1* mueren durante los primeros estadios de desarrollo debido a la hipersensibilidad que las células madre embrionarias muestran a los agentes dañinos del ADN (Muto et al., 2002). Estas células madre presentan una dramática pérdida de la metilación del ADN, una deficiente conformación estructural de la cromatina y expresan elementos repetitivos (Sharif et al., 2016; Papait et al., 2007). Asimismo, se ha relacionado a UHRF1 con el desarrollo apendicular, pues los ratones KO para *Uhrf1* poseen huesos más cortos, así como alteraciones en la placa de crecimiento ocasionadas por una desregulación de la maduración y proliferación condrogénicas (Yamashita et al., 2018).

Por el contrario, los KO para *Uhrf2* son viables y carecen de defectos morfológicos, aunque hay evidencias que relacionan a dicho gen con la patogénesis de enfermedades neurodegenerativas (Chen et al., 2017; Chen et al., 2018).

2.2.1.4 RNAs no codificantes

A pesar del importante auge que ha experimentado en los últimos años el campo de la epigenética, poco se sabe acerca de los mecanismos por los cuales las distintas modificaciones se añaden en zonas específicas del genoma. Este problema se solventó de manera parcial gracias al descubrimiento de los RNAs no codificantes (*non-coding RNAs*, *ncRNAs*), moléculas capaces de interactuar con complejos modificadores de la cromatina en regiones genómicas concretas induciendo un silenciamiento transcripcional (Taverna et al., 2002; Volpe et al., 2002). Dicho proceso, en el que también participan algunos enzimas encargados de metilar las colas de las histonas, impulsa la conversión de la cromatina hacia un estado reprimido o de heterocromatina (Palazzo y Lee., 2015).

Los RNAs no codificantes son pequeñas moléculas de RNA de cadena simple que no se traducen a proteínas y que juegan un papel esencial en el control epigenético (Wei et al., 2017). Atendiendo a su longitud pueden clasificarse en varias clases:

- Los **RNAs de pequeño tamaño**: presentan entre 18-300 nucleótidos y participan en múltiples procesos entre los que destacan la síntesis del ADN telomérico, la modulación de la transcripción y la modificación estructural de la cromatina. A este grupo pertenecen los microRNAs (miRNAs), los RNAs pequeños de interferencia (*small interfering RNA*, *siRNAs*), los RNAs pequeños nucleolares (*small nucleolar RNAs*, *snRNAs*), los RNAs moduladores pequeños (*small modulatory RNAs*, *smRNAs*) o los RNAs asociados con la proteína PIWI (*Piwi interacting RNAs*, piRNAs) (Liu et al., 2018; O'Brien et al., 2018; Kufel y Grzechnik., 2019).
- Los **RNAs medianos o largos**: pueden llegar a tener más de 200 nucleótidos y están implicados en la inactivación del cromosoma X, la demetilación del ADN y la transcripción génica (Hanley et al., 2018; Wang et al., 2017).

Aunque los microRNAs son quizás los RNAs no codificantes más estudiados, debido a su participación en el silenciamiento génico postranscripcional a nivel de los RNAs mensajeros, no parecen intervenir en la regulación epigenética de la cromatina y por ello no serán descritos en la presente tesis. Por el contrario, los RNAs asociados con la proteína PIWI (piRNAs), que se transcriben a partir de los transposones, sí que tienen un rol importante en el campo de la epigenética (Malone y Hannon., 2009; Ozata et al., 2019). Expresados en las células madre y en la línea germinal, los piRNAs se encargan de mantener la estabilidad genómica silenciando a los elementos transponibles en momentos clave del desarrollo donde se produce una reprogramación epigenética (Ozata et al., 2019). Así, los ratones KO para las proteínas PIWI, MILI1 o MILI2 sufren esterilidad debido a la imposibilidad para silenciar ciertos elementos repetitivos durante la espermatogénesis (Carmell et al., 2007; Kuramochi-Miyagawa et al., 2004). Como se describió anteriormente, estos elementos son capaces de insertarse en otras zonas del genoma causando una interrupción del mismo y de producir recombinaciones aberrantes entre regiones cromosómicas. Para evitarlo, los piRNAs se unen a las proteínas PIWI provocando un silenciamiento génico postranscripcional y la degradación del RNA del transposón (Fu y Wang., 2014). Una de las características más interesante de estos RNAs no codificantes es que una vez transcritos pueden importarse de nuevo al núcleo para inducir el silenciamiento permanente del transposón del que proceden mediante la metilación de su ADN, como ocurre tras la unión de un piRNA a la proteína MIWI2 (Manakov et al., 2015).

Los RNAs no codificantes de larga cadena (*Long non-coding* RNAs, lncRNAs) también participan de manera notable en la regulación génica o la diferenciación celular e intervienen en determinados procesos epigenéticos como la inactivación del cromosoma X y el silenciamiento de los genes *Hox* (Dhanoa et al., 2018). Sus más de 200 nucleótidos de longitud les otorgan una enorme especificidad alélica para actuar como guías, acercando a los complejos proteicos hasta el sitio específico del ADN en el que deberán actuar, como ocurre con Xist (Ransohoff et al., 2018). Este lncRNA presenta entre sus 17kb de nucleótidos una secuencia repetida que es reconocida por el complejo PRC2, una metiltransferasa que tiene afinidad por la lisina 27 de la histona H3. De esta manera, Xist guía a PRC2 hasta el cromosoma X, lugar donde el RNA no codificante se transcribe, para que metile a la histona H3 y se desencadene la inactivación cromosómica (Sahakyan et al., 2018).

En otras ocasiones, los RNAs largos no codificantes sirven de soporte o andamio sobre el que diferentes complejos epigenéticos, que han de actuar conjuntamente, pueden disponerse (Bhat et al., 2016). Este es el caso de HOTAIR, un lncRNA transcrito a partir de uno de los grupos de genes de la familia génica *Hox*, el “cluster” HOXD. Al igual que en el ejemplo de Xist, HOTAIR es capaz de guiar a PRC2 hasta el “cluster” HOXD, donde actúa como andamio para que otros complejos modificadores, como LSD1 (*Lysine-specific histone demethylase 1A*), se unan (Rinn et al., 2007). Así, HOTAIR reúne en una misma localización a dos complejos encargados de reprimir la transcripción, por un lado, a PRC2, metiltransferasa que actúa sobre H3K27, y por el otro a LSD1, demetilasa que elimina la metilación de H3K4 (Tsai et al., 2010). La asociación de ambos complejos, mediada por el RNA no codificante, reprime y compacta la cromatina del “cluster” HOXD produciendo el silenciamiento de los genes *Hox* localizados en él.

2.3 Daño en el ADN

Los organismos eucariotas están expuestos de manera continuada a estímulos nocivos capaces de ocasionar lesiones en las hebras de ADN que pueden alterar la expresión de genes críticos para el correcto funcionamiento celular. Su interacción con el ambiente hace al genoma vulnerable frente a mutágenos exógenos como pueden ser los rayos X, los gamma o los ultravioleta (UV); ondas electromagnéticas que al reaccionar con las moléculas de agua de la célula pueden inducir la liberación de radicales libres capaces de provocar roturas en el ADN (Kavanagh et al., 2013). Este daño también puede producirse de manera endógena y directa durante la replicación o como consecuencia de la generación de especies reactivas del oxígeno (*Reactive Oxygen Species, ROS*) propias del metabolismo fisiológico de la célula (De Bont y van Larebeke, 2004).

2.3.1 Respuesta a la rotura del ADN

Las roturas generadas, múltiples y al azar, pueden afectar a la doble hélice (*Double-Strand Breaks, DSBs*) o a una de las hebras (*Single-Strand Breaks, SSBs*) y su reparación implica la activación de una rápida respuesta coordinada (*DNA damage response, DDR*) con el fin de mantener la integridad genómica (Jackson y Bartek., 2009).

Dependiendo de la gravedad de la lesión, esta respuesta puede ir acompañada de la detención del ciclo celular, de un fenotipo secretor asociado a senescencia o incluso de la entrada en el programa de muerte celular. A nivel molecular, la respuesta al daño en el ADN está mediada por una cascada de señalización capaz de activar de forma específica y controlada diferentes grupos proteicos (Shiloh., 2003). El primer paso es la detección de la lesión, mediada por proteínas que reconocen la disrupción del ADN o las alteraciones de la cromatina que flanquean a dicha rotura. La vía de señalización utilizada para la transmisión del mensaje es la fosforilación proteica y es generada por las quinasas ATM (*Ataxia-Telangiestasia Mutated*), ATR (*ATM and Rad3 Related*) y DNA-PKcs (*DNA Protein Kinase catalytic subunit*); todas ellas pertenecientes a la familia de las PIKKs (*PI-3-kinase-related-kinases*) (Su., 2006). Por medio de proteínas mediadoras, la señal de daño se propaga por el núcleo hasta que se ejecutan las acciones necesarias para solventar el problema. Recientemente se ha demostrado que ATM, junto con c-Cbl (*Casitas B-lineage lymphoma*), estabiliza al receptor TGF β RII (*TGF- β type II receptor*) activando la cascada de señalización de TGF- β y promoviendo la detención del ciclo celular (Li et al., 2019).

En respuesta a roturas de doble hebra, ATM y DNA-PKcs son atraídas hacia la zona dañada por el complejo mediador Mre11-Rad50-Nbs1 (MRN) y el complejo Ku70/Ku80, respectivamente (Horejsi et al., 2004). Una vez en el lugar de la lesión, se activan catalíticamente y fosforilan a la variante de la histona H2A, H2AX, en la serina 139, a una distancia de unos 4 residuos del extremo C-terminal generado tras la rotura convirtiéndola en γ -H2AX (Leatherbarrow et al., 2006). Aunque en un primer momento la señal se limita a los flancos de la lesión, rápidamente se propaga hacia ambos lados llegando a ocupar un territorio de dos megabases de cromatina. La unión de MDC1 (*Mediator of DNA damage Checkpoint 1*), una proteína que estabiliza los extremos rotos, genera una reacción en cadena que amplifica la señal al impulsar la unión del complejo MRN, que recluta de nuevo a ATM para que fosforile a H2AX expandiendo su distribución (Lou et al., 2006). De esta manera, la unión de γ -H2AX-MDC1-MRN extiende el radio de acción de ATM hasta zonas alejadas de la lesión; desencadenándose así una señalización global del daño (Scully y Xie., 2013). MDC1 también es capaz de reclutar a RNF8 (*E3 ubiquitin-protein ligase*), quien ubiquitilará a las histonas H2A y H2AX (Mailand et al., 2007) (Fig. 6A).

La modificación de estas histonas es clave para determinar el tipo de reparación de la DSB. Así, si H2A-Ub interacciona con BRCA1 (*Breast Cancer 1 protein*) la reparación se produce por recombinación homóloga (*Homologous Recombination, HR*), mientras que si se une a 53BP1 (*p53 Binding protein 1*) la reparación se realiza mediante la fusión de los extremos no homólogos del ADN (*Non Homologous End Joining, NHEJ*) (Fradet-Turcotte et al., 2013; Aly y Ganesan., 2011).

Las roturas de cadena sencilla son señalizadas por RPA (*Replication Protein A*) para atraer a ATR, una quinasa que forma parte de un complejo heterodimérico con ATRIP (*ATR Interacting Protein*) y cuya actividad catalítica sólo se dispara al interactuar con TOPBP1 (*DNA topoisomerase 2-binding protein 1*) (Kumagai et al., 2006). Dicha interacción está mediada por la unión de varios complejos proteicos como Rad17, RFC (*Replication Factor C*) y el complejo 9-1-1 (Rad9, Hus1 y Rad1) al ADN de doble cadena que flanquea a la zona rotura (Majka et al., 2006) (Fig. 6B).

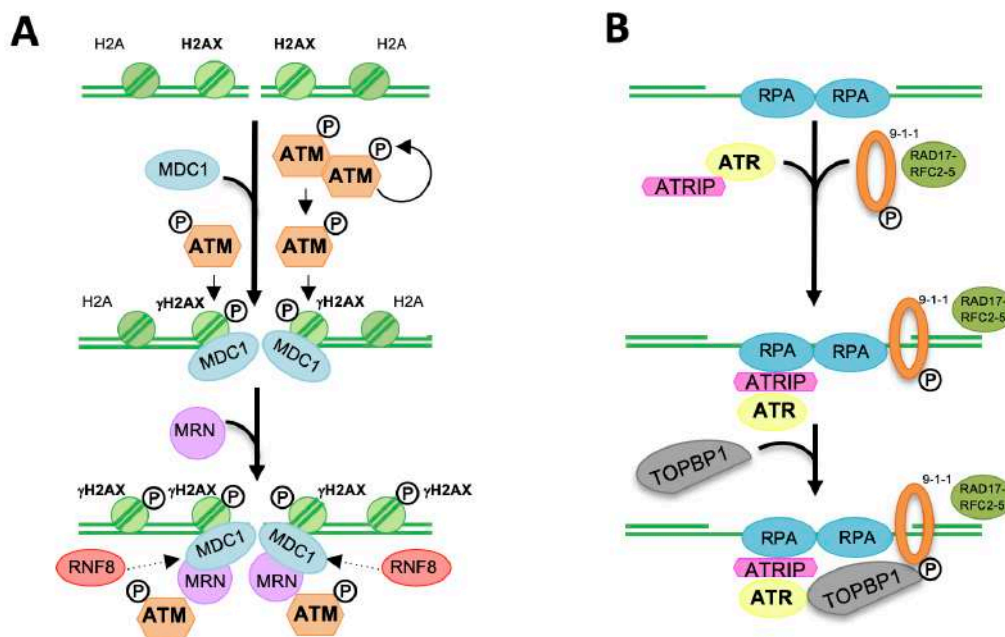


Figura 6. Mecanismo de respuesta al daño en el ADN (DDR). La rotura de la doble hebra dispara la activación de ATM que se monomeriza y autofosforila. ATM añade un grupo fosfato a la serina 139 de la histona H2AX, convirtiéndola en γH2AX y creando un sitio de unión a MDC1. El reclutamiento de MRN amplifica la señal de activación de ATM contribuyendo a la propagación de la γH2AX por la cromatina (A). En las SSBs, TOPBP1 es necesaria para la activación de ATR, quinasa reclutada por RPA (B). (Modificado de Palanca, 2014 y Cimprich y Cortez., 2008. doi: 10.1038/nrm2450).

2.3.2 Reparación de la rotura del ADN

La señal emitida frente a la lesión en el ADN desencadena una amplia respuesta para coordinar su reparación; en el caso de que esta no sea satisfactoria, la acumulación del daño puede inducir una pérdida de la capacidad regenerativa del tejido y, por consiguiente, un envejecimiento del mismo, o incluso provocar la muerte programada de la célula (apoptosis) (Mladenov e Iliakis., 2011). La célula dispone de varios mecanismos para garantizar la estabilidad genómica y dos de ellos son fundamentales a la hora de reparar alteraciones estructurales de la hebra de ADN como son las roturas de doble cadena. Aunque el proceso de DDR es independiente del agente que induce el daño y de la fase del ciclo celular, la reparación suele producirse por recombinación homóloga tras la replicación del ADN o mediante el mecanismo de NHEJ en el periodo G1 (Aly y Ganesan., 2011). De este modo, las células con capacidad proliferativa pueden reparar las DSBs utilizando ambos mecanismos mientras que las postmitóticas sólo emplean el NHEJ.

La recombinación homóloga (*Homologous Recombination, HR*) es una vía de reparación de alta fidelidad basada en el apareamiento de las secuencias dañadas con la cromátida homóloga intacta que suele ocurrir en las fases S y G2 (Price y D'Andrea., 2013). Para que dicho proceso tenga lugar, H2A-Ub debe reclutar a BRCA1 (*Breast Cancer 1*), quien atrae a las nucleasas para retirar los nucleótidos de los extremos 5' dañados. Para estabilizar los extremos 3' libres se coloca la proteína RPA que, a su vez, también se encarga de reunir a Rad51 (Huertas y Jackson., 2009). Esta proteína se encarga de dirigir la invasión y el apareamiento del extremo 3' con la hebra homóloga no dañada de la cromátida hermana para que la ADN polimerasa acceda. Tras la replicación de la hebra, las cadenas de ADN se sellan en el lugar de la lesión gracias a la acción de las ADN ligasas (West., 2003; Panier y Boulton., 2013).

La reparación por recombinación de extremos no homólogos (*Non-Homologous End-Joining, NHEJ*), por el contrario, se basa en la unión directa de los extremos rotos, lo cual ocasiona una pérdida de información genética que, irreversiblemente, altera la fidelidad de las secuencias génicas del ADN reparado (Chiruvella et al., 2013). A pesar de ser un método propenso a errores, es el mecanismo de reparación más común en los mamíferos y suele ocurrir en las fases del ciclo celular G0 y G1 (Nakamura et al., 2010). En este tipo de reparación, 53BP1 se une a H2A-Ub para reclutar al heterodímero Ku70/80.

Este complejo evita que los extremos 5' generados tras la rotura sean degradados por las nucleasas y atrae a las DNA-PKcs al lugar de la lesión con el fin de que los extremos rotos se mantengan próximos (Mladenov e Iliakis., 2011). Artemis, PNKP (*Polynucleotide Kinase 3'-Phosphatase*), APE1 (*Apurinic/apyrimidinic endonuclease 1*) o TDP1 (*Tyrosyl-DNA phosphodiesterase 1*) son algunas de las nucleasas que acceden a la zona para cortar los extremos que flanquean la rotura. Una vez que esto se ha llevado a cabo, un complejo compuesto por XRCC4 (*X-ray repair cross-complementing protein 4*), ADN ligasa IV y XLF (*XRCC4-like factor*) fusiona los extremos de ADN (Panier y Boulton., 2013) (Fig. 7).

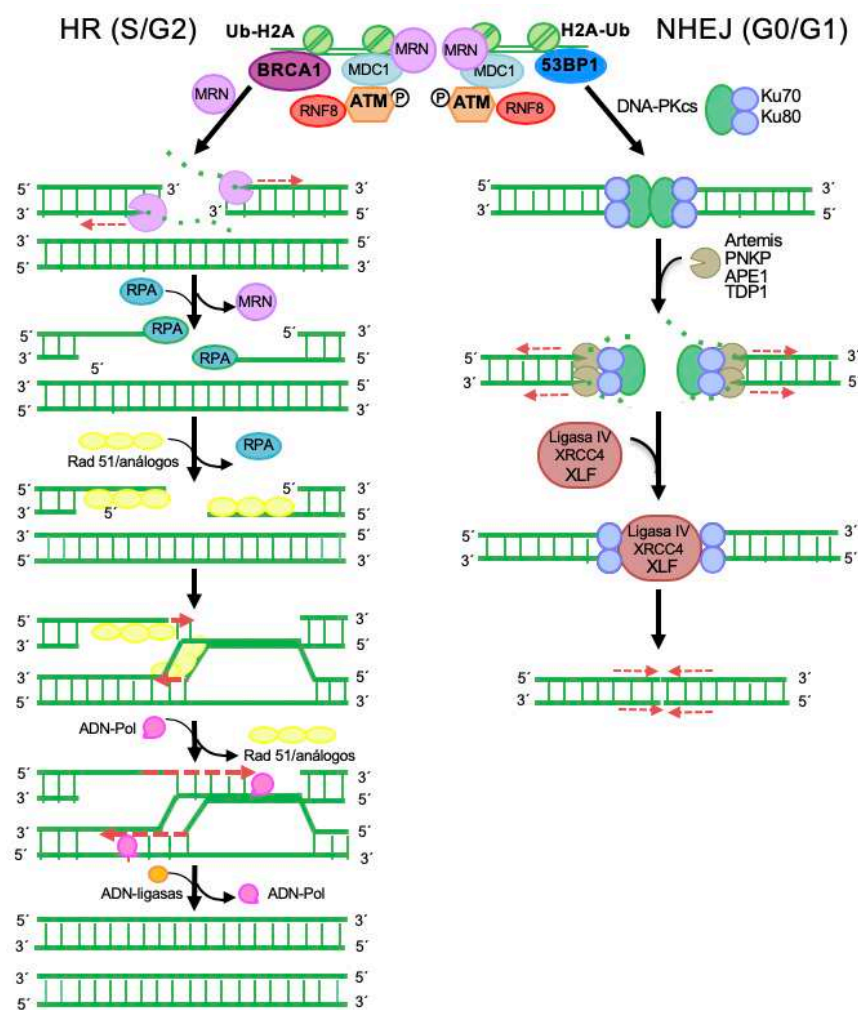


Figura 7. Mecanismos de reparación de las DSBs. La reparación por HR ocurre en las fases S/G2 del ciclo celular y requiere la unión de BRCA1 a la H2A-Ub. Tras la estabilización de los extremos por RPA, Rad51 dirige el entrecruzamiento del extremo 3' con la hebra intacta de la cromátida hermana para que la DNA polimerasa replique de novo los fragmentos de ADN. Durante la NHEJ, 53BP1 se une a la H2A-Ub para regular la unión del complejo Ku70/Ku80-DNA-PKcs a los extremos del ADN dañado. Los nucleótidos que flanquean la rotura son eliminados por Artemis, PNKP, APE1 y TDP1; finalmente, un complejo compuesto por varias ligasas une ambos extremos. (Modificado de Palanca, 2014).

2.3.3 Consecuencias del daño en el ADN

La incorrecta reparación de la rotura puede ocasionarle a la célula serios problemas capaces de desencadenar mecanismos de senescencia y apoptosis. La decisión de optar por estas respuestas y no por otras menos severas viene determinada por la intensidad de la señal, proporcional al número y gravedad de las lesiones, y por la sensibilidad al daño que presente el tipo celular.

2.3.3.1 Senescencia

La senescencia es un proceso irreversible, en respuesta a una serie de señales como la exposición a estrés oxidativo o la señalización inducida por daño en el ADN, que conduce a la disfunción del tejido y al envejecimiento del organismo (Childs et al., 2015; Baar et al., 2017). Se caracteriza por una detención de la proliferación celular y está mediado por las vías de señalización de p53-p21 y/o p16^{INK4a} (Pieur et al., 2011). Las células senescentes presentan un fenotipo secretor asociado a senescencia (*Senescence-Associated Secretory Phenotype, SASP*) debido a su capacidad para liberar quimiocinas, factores de crecimiento (TGF- β , IGF1...), proteasas (metaloproteinasas MMP2, MMP9 y ADAMTS9) y citoquinas inflamatorias (interleucinas: IL8L1, IL8L2) al microambiente celular y tisular (Acosta et al., 2013). Aunque la función principal de dichas moléculas es perpetuar el estado antiproliferativo y propagar la senescencia de manera autocrina y paracrina; también contribuyen a la eliminación de las células senescentes promoviendo la fagocitosis para remodelar el tejido y reparar el daño (Hoenicke y Zender., 2012; Kuilman y Peeper., 2009).

La senescencia celular se considera un proceso dinámico que puede implicar cambios epigenéticos en la metilación del ADN, las modificaciones postraduccionales de las histonas, la remodelación de la cromatina y la expresión de los RNAs no codificantes (Lowe et al., 2016). Estas modificaciones epigenéticas interaccionan entre sí, regulan la estructura de la cromatina y la expresión génica facilitando la disfunción de los telómeros, el daño en el ADN y el estrés oxidativo típicos de la senescencia.

En algunos sistemas se ha observado que las células senescentes presentan una hipometilación global del ADN fruto de una incorrecta o reducida expresión de DNMT1, que afecta al enrollamiento de la doble hebra y expone sus extremos haciéndolos más vulnerables a las roturas (Oh et al., 2015). Sin embargo, existen zonas concretas del genoma, conocidas como focos de heterocromatina asociados a senescencia (*Senescence-associated Heterochromatic Focus, SAHF*), que sufren procesos de hipermetilación asociados al reclutamiento de la DNMT1 por parte de la proteína HP1 (Smallwood et al., 2007; Zhang et al., 2007). En estos ambientes de silenciamiento transcripcional es frecuente encontrar histonas hipoacetiladas, marcas asociadas con la represión génica como H3K9me3 y variantes de la histona H2A como la macroH2A (Narita., 2007; Bandyopadhyay et al., 2007; Chen et al., 2015). Además, las células senescentes tienen una cromatina más laxa como consecuencia de la pérdida de nucleosomas; dicha reducción en la compactación de la hebra de ADN puede ocasionar defectos en el *splicing* de los pre-RNA mensajeros (Carrillo et al., 2016). Los complejos remodeladores de la cromatina también son susceptibles de sufrir cambios durante el proceso de senescencia, ocasionando daño en el ADN, inestabilidad genómica o estrés oxidativo. El complejo INO80, por ejemplo, participa en la correcta progresión del ciclo celular uniéndose al promotor de p21^{Cip1} y regulando negativamente su expresión. La eliminación de dicho complejo aumenta la expresión de p21^{Cip1} y detiene el ciclo celular en G2/M (Min et al., 2013; Cao et al., 2015). Bajo estas circunstancias también es frecuente observar la expresión de RNAs no codificantes (*non-coding RNAs, ncRNAs*) asociados a senescencia y regulados por p53 que intervienen en la proliferación y en la detención del ciclo celular (Gong et al., 2016). En otras ocasiones, los ncRNAs alteran los patrones de metilación de las células senescentes al actuar sobre los enzimas DNMT3A, DNMT3B y TET, como ocurre con miR-29 (Hu et al., 2015).

2.3.3.2 Apoptosis

La apoptosis es un tipo de muerte celular programada utilizada para la eliminación, de una forma controlada y por fagocitosis, de células dañadas o innecesarias. Es un proceso esencial durante el desarrollo embrionario que interviene en la maduración y remodelación de los tejidos y que se caracteriza por ocasionar cambios morfológicos y bioquímicos en las células que se van a morir (Hafner et al., 2019).

Entre ellos destacan la contracción celular, la condensación y fragmentación del núcleo, la aparición de ampollas o protuberancias en la membrana citoplasmática y la pérdida de adhesión con las células vecinas o la matriz extracelular (Meier y Vousden., 2007; Nishida et al., 2008; Montero y Hurlé., 2010). A diferencia de otros tipos de muerte celular, la apoptosis es un proceso activo que puede desencadenarse a partir de dos rutas diferentes de señalización molecular en función del tipo de estímulos que la activen.

2.3.3.2.A Vía intrínseca, vía de estrés o mitocondrial

Como consecuencia de un estímulo intracelular, por ejemplo, un daño en el ADN o la falta de un determinado factor de crecimiento, la vía intrínseca de la apoptosis se activa (Hassan et al., 2014; Zaman et al., 2014; Xu et al., 2015). Esta ruta está regulada por proteínas pertenecientes a la familia de BCL-2 (*B-cell lymphoma 2*), moléculas que se pueden clasificar en tres grandes grupos atendiendo a sus características funcionales y estructurales (Tan et al., 2011; Letai et al., 2002):

- **Proteínas efectoras proapoptóticas:** poseen tres dominios BCL-2 de homología (BH) BH1-3 y su activación aumenta la permeabilidad de la membrana mitocondrial externa. A este grupo pertenecen BAX (*BCL-2-associated X protein*) y BAK (*BCL-2 homologous antagonist killer*).
- **Proteínas proapoptóticas BH3:** inician la vía intrínseca y presentan un único dominio BH3 gracias al cual se unen a las proteínas antiapoptóticas. Moléculas como BIM (*BCL-2-interacting mediator of cell death*), BID (*BH3-interacting domain death agonist*) o PUMA (*p53-upregulated modulator of apoptosis*) forman parte de este grupo (Letai et al., 2002).
- **Proteínas antiapoptóticas BCL-2:** cuentan con todos los dominios BH e inhiben la apoptosis al actuar sobre las proteínas proapoptóticas (Czabotar et al., 2013).

Tras la activación de esta vía, las proteínas proapoptóticas BH3 movilizan a BAX y a BAK, quienes oligomerizan para formar macroporos en la superficie de la membrana externa de la mitocondria (Lomonosova y Chinnadurai., 2008).

La permeabilización de esta membrana promueve la salida hacia el citoplasma de proteínas como el citocromo c, quien tras unirse a APAF-1 (*Apoptotic Protease-activating factor 1*) induce la formación del apoptosoma. Estas moléculas están implicadas en la activación de la caspasa 9 así como de las caspasas ejecutoras 3 y 7, encargadas de la escisión de las proteínas celulares (Green y Llambi., 2015). Con el fin de asegurar la muerte de la célula, la serin-proteasa HTR2A (*5-Hydroxytryptamine Receptor 2A*, conocida como OMI) y SMAC (*Second mitochondria-derived activator of caspases*) bloquean la acción de los inhibidores endógenos XIAP (*X-linked inhibitor of apoptosis protein*) e IAP (*Inhibitor of apoptosis proteins*), respectivamente (Maas et al., 2010; Lopez y Tait., 2015; Zaman et al., 2014) (Figura 8).

Aunque las caspasas participan significativamente en el proceso de apoptosis, es importante mencionar que la mera permeabilización de la membrana mitocondrial externa es capaz de ocasionar la muerte celular como resultado de la pérdida de función de dicho orgánulo (Lopez y Tait., 2015). Además, la liberación y, posterior, translocación al núcleo de proteínas mitocondriales implicadas en la cadena respiratoria, como AIF (*Apoptosis-inducing factor*), promueven la fragmentación y condensación de la cromatina (Bano y Prehn., 2018).

2.3.3.2.B Vía extrínseca

La vía extrínseca de la apoptosis se induce tras la unión de una proteína extracelular, como por ejemplo Fas-L (*Fas ligand*) o TRAIL (*TNF-related apoptosis-inducing ligand*), a un receptor transmembrana de la familia del factor de necrosis tumoral (*Tumoral Necrosis Factor, TNF*) (Zaman et al., 2014). Estos receptores cuentan con un dominio citoplasmático de muerte (*Death domain, DD*) al que se unen proteínas adaptadoras como FADD (*Fas-associated death domain*) o TRADD (*TNF receptor-associated death domain*) para desencadenar una cascada de señalización iniciada por un complejo inductor de muerte (*Death-inducing signaling complex, DISC*) y mediada por caspasas (Goldar et al., 2015; Liu et al., 2017). La activación de la procaspasa 8 y de las caspasas 3 y 7 conduce a la escisión de diversas proteínas y a la apoptosis celular (Strasser et al., 2009). En otras ocasiones, como puede apreciarse en la figura 7, ambas vías apoptóticas convergen tras la activación de la caspasa 8.

Ésta actúa sobre BID produciendo su fragmentación (tBID), hecho que induce la oligomerización de BAX y BAK, el aumento de la permeabilidad de la membrana mitocondrial por la liberación del citocromo c y la activación de la ruta intrínseca (Walczak., 2013) (Fig. 8).

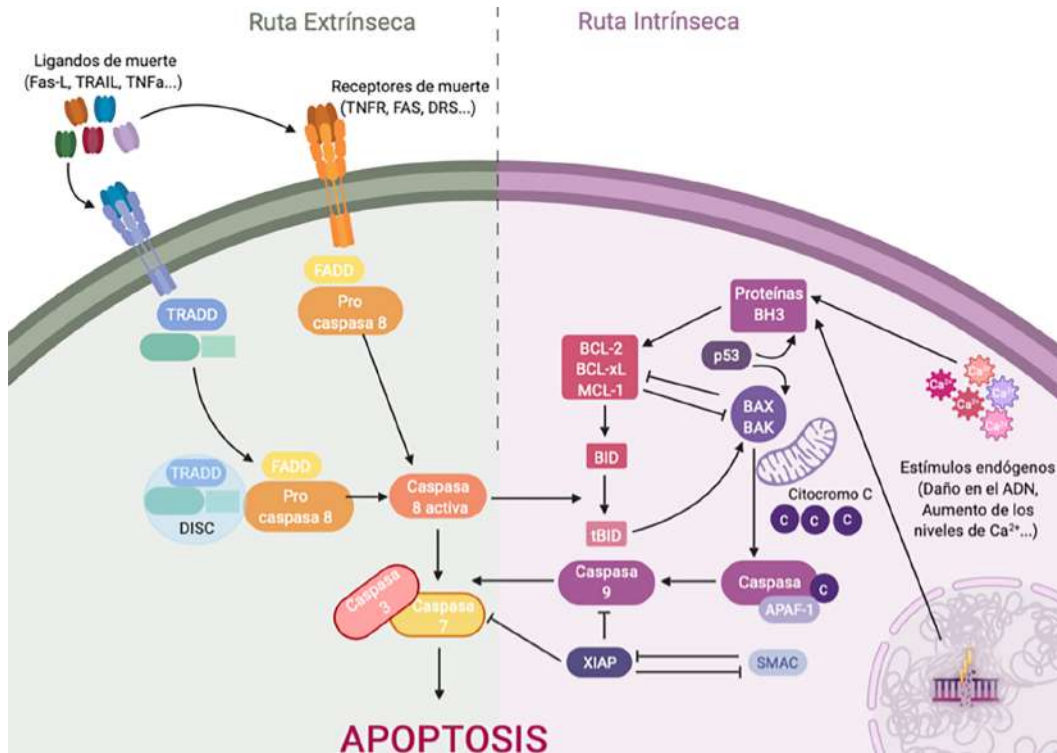


Figura 8. Vías de señalización activas durante el proceso de apoptosis. Representación esquemática de las dos vías de señalización, extrínseca e intrínseca, que pueden activarse durante el proceso de muerte celular por apoptosis.

La muerte celular por apoptosis es un proceso activo, que consume energía y que interviene en el mantenimiento de la homeostasis tisular y en la prevención del cáncer evitando la propagación y conservación de poblaciones celulares dañadas (Lopez y Tait., 2015; Luke et al., 2003). También juega un papel indispensable durante el desarrollo embrionario, periodo en el que a medida que el organismo va tomando forma, se produce una eliminación como compensación a la sobreproducción celular de los estadios iniciales (Ke et al., 2018). Un ejemplo característico de las funciones morfogénicas, derivadas de la apoptosis, durante el proceso de organogénesis lo observamos en la regresión del tejido del espacio interdigital de las extremidades embrionarias de los animales vertebrados tetrápodos.

2.4 Formación de las extremidades durante el desarrollo embrionario

Durante su desarrollo, los esbozos de las extremidades son estructuras de forma redondeada, que surgen a partir del estadio 15HH en los flancos del cuerpo del embrión, compuestas por agregados de progenitores musculoesqueléticos procedentes del mesodermo lateral y los somitas (Hamburger y Hamilton., 1951). En la zona distal de ese mesodermo, se establece la que ha sido denominada zona de progreso (*Progress Zone, PZ*) formada por células indiferenciadas con capacidad proliferativa que están protegidas por una capa de ectodermo que muestra un engrosamiento en el margen distal denominado cresta ectodérmica apical (*Apical Ectodermic Ridge, AER*) (Merino et al., 1999). Esta región marginal, es un importante centro señalizador de la extremidad en desarrollo que libera factores de crecimiento, como BMP (*Bone Morphogenetic Protein*), FGF (*Fibroblast Growth Factor*) o Wnt (*Wintless -INT*); para estimular la proliferación de los progenitores mesodérmicos, quienes se condensarán y formarán blastemas radiales de cartílago (Pan et al., 2005; Pajni-Underwood et al., 2007; Maatouk et al., 2009; Villacorte et al., 2010; Cunningham et al., 2011). Dichas condensaciones se irán segmentando para constituir los distintos elementos esqueléticos e irán alargándose gracias a la incorporación de nuevos progenitores en la zona distal. La interacción entre el mesodermo y la AER es imprescindible para el completo crecimiento de la extremidad (Macias et al., 1997).

2.4.1 Condrogénesis

La condrogénesis en el esbozo de la extremidad es responsable de la formación de una estructura cartilaginosa que actúa como molde para el esqueleto óseo que presentará el individuo. Esta compleja sustitución, que tiene lugar a lo largo del desarrollo embrionario, se conoce como osificación endocondral y ocurre en la mayor parte de los huesos del organismo a excepción de algunos huesos planos, como los del cráneo, donde se produce una osificación intramembranosa (Clarke., 2008; Wang et al., 2014).

Durante el desarrollo de las extremidades, las estructuras radiales que dan lugar a los dedos están compuestas por células mesenquimales multipotentes que proliferan y se agregan (Wang et al., 2014). Este hecho es de vital importancia para la diferenciación y parece estar regulado por interacciones célula-célula y célula-matriz. Entre las moléculas señalizadoras que participan en la iniciación y el mantenimiento de la actividad condrogénica durante el desarrollo de la extremidad destacan los miembros de la subfamilia de TGF- β (*Transforming growth factor* β). Éstos, aumentan la expresión de moléculas de adhesión como fibronectina, N-cadherina o tenascina que influyen en la condensación y favorecen la conversión de los progenitores musculoesqueléticos a condrocitos maduros (Oberlender y Tuan., 1994; DeLise et al., 2000). Los BMPs, Wnt y los FGFs también intervienen en la formación de las condensaciones precartilaginosas regulando la transcripción de *Sox9* (*SRY-box9*) (Goldring et al., 2006). Bajo estas condiciones, las células condensadas proliferan y se diferencian a condrocitos, quienes presentan una morfología redondeada y expresan genes específicos de cartílago, como *Sox9* (Hino et al., 2014). Comienza así a producirse una transformación gradual de la matriz extracelular en la que se origina una red elástica e interconectada con características únicas de rigidez y flexibilidad alrededor de los condrocitos. El colágeno I es sustituido por los colágenos de tipo II, IX y XI; y el agregano (*Aggrecan*) se convierte en el proteoglicano mayoritario, aumentando las propiedades viscoelásticas de la matriz extracelular (Knudson., 2003). La proliferación activa de los condrocitos permite el crecimiento longitudinal de una estructura cartilaginosa que adquiere una forma similar al hueso al que va a dar origen (Long y Ornitz., 2013). A medida que esto ocurre, se produce un proceso de osificación entre la diáfisis o zona central y las epífisis o extremos del hueso que lleva asociado la formación de una placa de crecimiento óseo, una estructura compleja donde se organiza el cartílago. En ella, los condrocitos se agrupan formando columnas paralelas al eje de crecimiento de la estructura y producen importantes cantidades de matriz extracelular. En los márgenes de esta zona proliferativa se localiza la región prehipertrófica, caracterizada por la presencia de células postmitóticas alargadas que expresan IHH (*Indian hedgehog*), un factor de señalización que controla la tasa de maduración de los condrocitos. Una vez que los condrocitos dejan de proliferar y se hipertrofian, comienzan a producir una matriz extracelular mineralizada rica en colágeno tipo X, MMP13 (*Matrix metalloproteinase 13*) y VEGF (*Vascular endothelial growth factor*) (Inada et al., 2004; Onyekwelu et al., 2009).

Las células localizadas en la periférica de las condensaciones, de aspecto más alargado y aplanado, se mantienen indiferenciadas y dan lugar al pericondrio, una capa de tejido conjuntivo denso que nutrirá al cartílago. Durante el proceso de osificación endocondral, el pericondrio se convertirá en periostio y formará un collar de tejido óseo alrededor de la zona central del molde cartilaginoso. Los factores liberados por los condrocitos hipertróficos contribuyen en el remodelado y la calcificación de la matriz, evitando la difusión de sustancias y ocasionando la muerte de los condrocitos localizados en dicha zona (Behonick et al., 2007). Además, intervienen en la invasión del tejido vascular, imprescindible para que los progenitores óseos puedan colonizar la zona y diferenciarse a osteoblastos (Yang et al., 2012; Hu y Olsen., 2016) (Fig. 9).

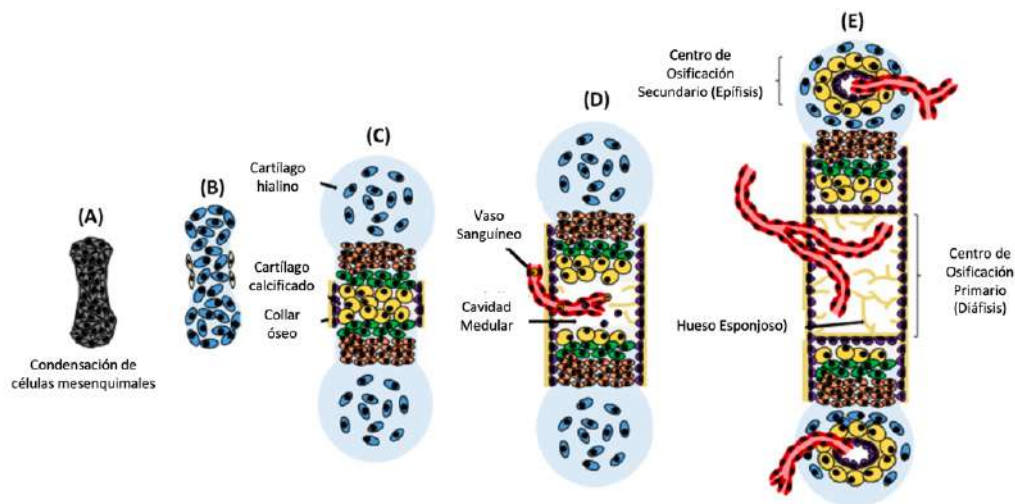


Figura 9. Esquema de la osificación endocondral. Las células mesenquimales se condensan y diferencian a condrocitos para formar una estructura cartilaginosa que servirá de molde para el futuro hueso al que dará lugar (A y B). La proliferación continuada de los condrocitos permite la elongación de la estructura; posteriormente estas células sufren un proceso de hipertrofia y comienzan a sintetizar componentes de la matriz extracelular que calcifican el entorno (C). También liberan factores, como VEGF, que intervienen en la formación de la vascularización y que permiten la entrada de los progenitores osteogénicos, así como su diferenciación a osteoblastos (D y E). (Modificado de Allas et al., 2019. doi:10.1016/j.bone.2018.10.004).

Durante el desarrollo de las extremidades, los elementos esqueléticos se separan por regiones que constituirán las futuras articulaciones donde el mesénquima se mantiene indiferenciado. Las articulaciones constan de una cavidad articular, recubierta de un cartílago capaz de soportar el estrés mecánico y de amortiguar los movimientos de dicha unión, que separa las estructuras de contacto (Staines et al., 2013).

Diferente al tejido condrogénico que forma los huesos, el cartílago articular está compuesto principalmente por una red de colágenos y proteoglicanos que constituye la matriz extracelular sobre la que se disponen los condrocitos (Pitsillides y Ashhurst., 2008). A diferencia de lo que ocurre durante la osificación endocondral, este tipo de células no siguen una secuencia de proliferación, maduración, hipertrofia, apoptosis y osificación (Staines et al., 2013). Aunque inicialmente se trata de una masa celular densa y homogénea compuesta por células de pequeño tamaño, a medida que el desarrollo avanza se divide en tres zonas: dos capas condrogénicas, que recubren las epífisis de los elementos esqueléticos en crecimiento, y una capa intermedia, donde se labra la cavidad articular que constituirá, terminado el desarrollo, el cartílago articular (Ito y Kida., 2000) (Fig. 10).

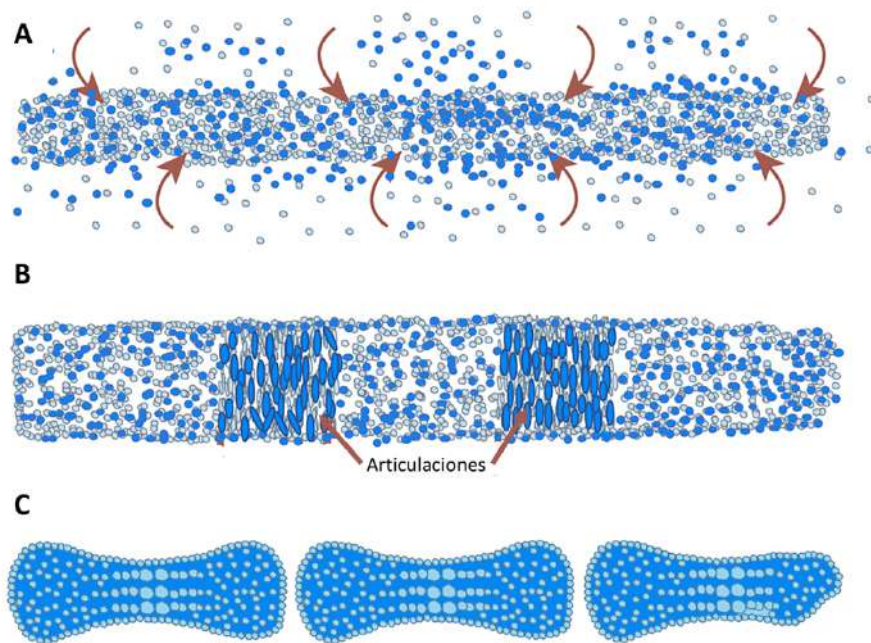


Figura 10. Condrogénesis y formación de las articulaciones. Durante el proceso de formación del cartílago, los progenitores condrogénicos se agregan para constituir los radios digitales; esta incorporación ocurre principalmente en la punta del dedo en crecimiento. Sin embargo, también se ha descrito que algunos progenitores se incorporan, como indican las flechas de este esquema, a nivel del primordio de las articulaciones pero no en el resto de la superficie, donde el pericondrio aísla al cartílago del mesénquima vecino (A). A lo largo de estas estructuras se disponen zonas de cartílago articular que darán lugar a las articulaciones (B). Tras la diferenciación e hipertrofia, los condrocitos comienzan a sintetizar componentes de la matriz extracelular que calcifican el entorno (C). (Adaptado de Mariani y Martin., 2003. doi:10.1038/nature01655).

2.4.2 Apoptosis durante la formación de las extremidades

Al mismo tiempo que se van formando los elementos que compondrán el esqueleto de la extremidad, un gran número de células indiferenciadas experimenta un proceso de muerte por apoptosis. Este proceso de eliminación celular en la extremidad en desarrollo juega un papel clave en su remodelado, observándose en estadios de desarrollo muy tempranos áreas o regiones de muerte como la zona necrótica anterior (*Anterior Necrotic Zone, ANZ*), la zona necrótica posterior (*Posterior Necrotic Zone, PNZ*) y el área opaca (*Opaque Patch*) (Hinchliffe; 1982). A medida que el desarrollo avanza, se pueden observar áreas de muerte en las regiones interdigitales (*Interdigital Apoptotic Zones, IAZ*) cuya distribución espaciotemporal determina la morfología de los dedos de la especie en desarrollo (Hurle y Colvee., 1982; Weatherbee et al., 2006) (Fig. 11).

Una vez que los dedos se han constituido y que la AER ha cesado la estimulación de los progenitores mesodérmicos, las células del tejido interdigital detienen la proliferación y se desencadena su muerte por apoptosis (Garcia-Martinez et al., 1993). Además, en estas zonas se observan células con un incremento en el número de lisosomas, alteraciones en su citoesqueleto fruto de la degradación de la matriz extracelular y fenómenos de autofagia (D'Eletto et al., 2012; Zuzarte-Luis et al., 2007). La eliminación del tejido interdigital, por fagocitosis, va acompañada de la desaparición de los vasos sanguíneos presentes en él (Francisco-Morcillo et al., 2014; Lorda-Diez et al., 2015b). Se ha sugerido que la anulación tardía de estos componentes del sistema vascular actúa localmente produciendo ROS y ocasionando un estrés oxidativo que puede afectar a componentes celulares tan importantes como las mitocondrias y, por consiguiente, potenciar la muerte de las células presentes en el tejido (Eshkar-Oren et al., 2015; Schnabel et al., 2006; Cordeiro et al., 2019). Finalmente, y tras su remodelado anatómico, el esqueleto de la extremidad quedará compuesto por 3 elementos. El estilopodio es la región proximal de la extremidad en la que se localiza el húmero (extremidad superior) o el fémur (extremidad inferior). El zeugopodio es la zona intermedia y comprende a la pareja de elementos esqueléticos cúbito-radio (ulna-radio) en la extremidad superior o tibia-peroné (tibia-fíbula) en la extremidad inferior. En la parte más distal del miembro se localiza el autopodio, una región subdividida en basipodio (carpos y tarsos), metapodio (metacarpos y metatarsos) y acropodio (falanges) (Fischer y Blickhan., 2006).

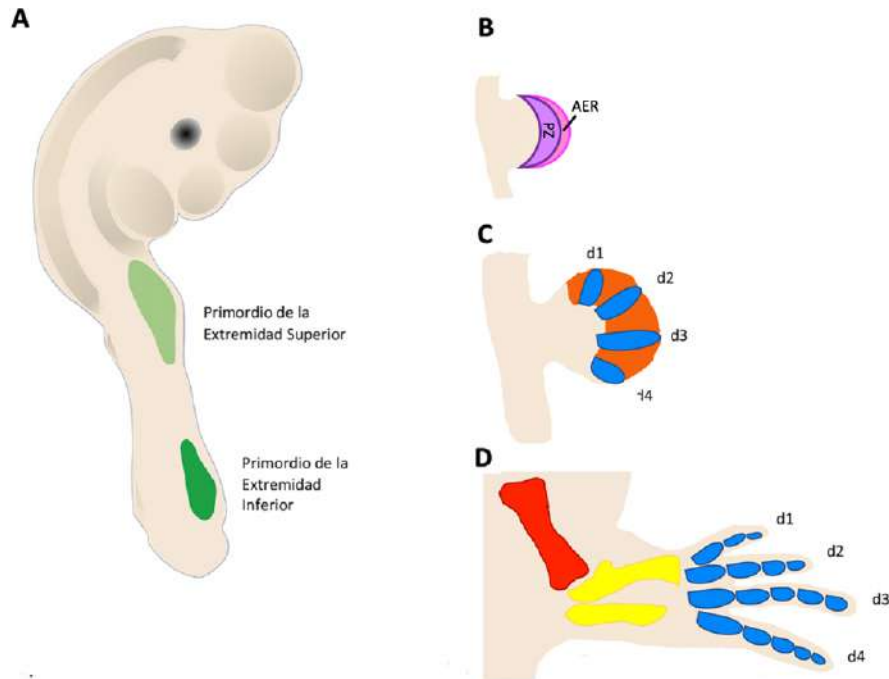


Figura 11. Esquema de la formación de las extremidades durante el desarrollo embrionario. Los primordios de las extremidades surgen de los flancos del embrión de pollo a partir del estadio 15HH (A). En ellos, las poblaciones celulares de la zona de progreso (PZ, color morado) y de la cresta ectodérmica apical (AER, color rosa) interactúan y comparten señales para dar lugar a una estructura con aspecto de pala (B). En esta región, pueden apreciarse las áreas de formación del cartílago (d1-d4, en color azul) que posteriormente se transformarán, mediante un proceso de osificación endocondral, en hueso. Las zonas donde se producirán fenómenos de muerte celular, como el espacio interdigital, aparecen coloreadas en naranja (C). Una vez que el desarrollo de la extremidad ha finalizado, en ella se pueden apreciar tres elementos diferentes: el estilopodio (en color rojo), el zeugopodio (de color amarillo) y el autopodio (en color azul). (Modificado de Mariani y Martin., 2003. doi:10.1038/nature01655).

2.4.3 Epigenética durante la formación de las extremidades

La formación de las extremidades durante el desarrollo embrionario es un proceso muy organizado y controlado, en el que participan numerosos factores que han de actuar en momentos puntuales para que el resultado sea satisfactorio. Hasta la fecha, un gran número de estudios han demostrado que la contribución de los modificadores epigenéticos es clave para regular la transición cartílago-hueso; a continuación, se muestran algunos ejemplos.

2.4.3.1 Metilación del ADN

Como se mencionó en el apartado **2.2.1.1**, la metilación del ADN mantiene la integridad del genoma y es esencial para el silenciamiento de importantes factores de transcripción; sin embargo, su implicación en la condrogénesis aún no se conoce con exactitud (Bird., 2002; Hattori et al., 2007). En embriones de pollo se ha identificado una desmetilación del promotor del gen *Col10a1* (*Collagen type X alpha 1 chain*), durante la diferenciación de las células madre mesenquimales a condrocitos, que se correlaciona directamente con un aumento en la expresión de dicho gen (Zimmermann et al., 2008). Asimismo, ensayos *in vitro* utilizando células madre mesenquimales tratadas con dos potentes inhibidores de las DNMT, 5-azacitidina (*5-azacytidine*, *5-aza*) y 5-aza-2'-deoxicitidina (*5-aza-2'-deoxycytidine*, *5-aza-dC*), demostraron la implicación de estas enzimas (DNMTs) en la diferenciación osteogénica (El-Serafi et al., 2011; Zhou et al., 2009). A la hipometilación del genoma celular observada, se sumaba un incremento en la expresión de genes implicados en la diferenciación, así como la hipertrofia de los condrocitos presentes en las articulaciones (Zuscik et al., 2004; Haq., 2016). En ratones, también se ha visto que la DNMT3B es clave en la regulación de la diferenciación del cartílago articular y de los condrocitos hipertróficos (Shen et al., 2017; Wang et al., 2018; Xu et al., 2018).

De la misma manera que ocurre con la metilación, durante el desarrollo de las extremidades se producen variaciones en los niveles globales de la 5-hmC, fruto de los cambios en la expresión génica de los TET (*Ten-Eleven-Translocation dioxygenase*). El aumento de esta modificación epigenética se observa en genes asociados con el desarrollo del cartílago, como *Sox9* o *Col2a1*, poniendo de manifiesto el papel que dichos enzimas juegan en el proceso de condrogénesis (Taylor et al., 2016).

2.4.3.2 Modificaciones postraduccionales de las histonas

2.4.3.2.A Acetilación de las colas de las histonas

La acetilación de los residuos N-terminales de las histonas favorece la descompactación de la cromatina facilitando el acceso de la maquinaria transcripcional a regiones concretas del genoma. Así, esta modificación epigenética regula numerosos procesos celulares como la osificación endocondral o la formación del cartílago articular. Para ello, se requiere la participación de las HAT, histona-acetiltransferasas capaces de acoplarse a las secuencias de ADN reconocidas por factores de transcripción como RUNX2 (*Run-related Transcription factor 2*) y SOX9 (Bradley et al., 2011). La asociación de este último con el complejo acetiltransferasa CBP (*CREB-binding protein*)/p300 activa la expresión de genes específicos de cartílago durante la diferenciación condrogénica (Furumatsu et al., 2005; Tsuda et al., 2003).

A pesar de que se desconoce el papel que juegan las HDACs durante las primeras fases de la osificación endocondral, la idea más aceptada es que existe cierto grado de redundancia entre ellas a la hora de regular este proceso (Chang et al., 2004; Jeon et al., 2006). En etapas más avanzadas del mismo, se ha descrito la regulación de genes específicos de la matriz cartilaginosa, como *Acan* (*Aggrecan*) o *Col2A1* por parte de HDAC1 y HDAC2 (Bradley et al., 2011; Hong et al., 2009). HDAC1 también participa en la diferenciación de los osteoblastos, acoplándose a RUNX2 para reducir su actividad, y sus efectos estimuladores sobre p300 son necesarios para la diferenciación del cartílago (Lee et al., 2006; Furumatsu et al., 2005). Por su parte, HDAC3 y HDAC4 controlan el proceso de hipertrofia de los condrocitos gracias a su interacción con MEF2 (*Myocyte-specific Enhancer factor 2*) y ZPF521 (*Zinc finger protein 521*) (Bradley et al., 2011; Vega et al., 2004; Correa et al., 2010). Sin embargo, la unión de HDAC4 a RUNX2 impide que este factor de transcripción participe en la conversión de los condrocitos a células hipertróficas; por ello este enzima suele ser degradado por las caspasas gracias a la acción de p38-MAPK (*Mitogen-activated protein kinase p38*) (Zhou et al., 2015). RUNX2 también es regulado durante la maduración y diferenciación de los osteoblastos por HDAC5, mediante una ruta dependiente de TGF- β , por HDAC6 y HDAC7 (Kang et al., 2005; Westendorf et al., 2002; Jensen et al., 2009).

Las células en proliferación dispuestas en la placa de crecimiento presentan altos niveles de este último enzima quien, además, bloquea la proliferación de los condrocitos y la actividad de la β -catenina durante la osificación endocondral (Bradley et al., 2015). Los ratones KO para SIRT1, una de las HDAC dependientes de NAD⁺, se caracterizan por presentar retrasos en la mineralización de los huesos, altos niveles de MMP13 y deficiencias en componentes de la matriz extracelular como colágeno tipo II (Lemieux et al., 2005; Gabay et al., 2013). Este fenotipo tan alterado pone de manifiesto que las sirtuinas son enzimas clave en el mantenimiento de la homeostasis del cartílago (Gagarina et al., 2010; Oppenheimer et al., 2012).

2.4.3.2.B Metilación de las colas de las histonas

La adición de un grupo metilo a los extremos N-terminal de las histonas se asocia con una regulación, negativa o positiva, de la transcripción en función del residuo aminoacídico que se haya visto afectado. Este tipo de modificación epigenética está regulada de manera dinámica durante la osificación endocondral por varias histona metiltransferasas y demetilinas específicas de la H3K9 como PRDM2 (*PR domain zinc finger protein 2*) o SUV39H1 (*Suppressor of variegation 3-9, Drosophila homolog of 1*). Ambos enzimas se encuentran altamente expresados en los condrocitos hipertróficos durante el desarrollo de la placa de crecimiento (Ideno et al., 2013). En este proceso también interviene SETDB1 (*SET domain protein bifurcated 1*), una metiltransferasa que interacciona con HDAC4 y RUNX2 para reprimir la expresión de los genes diana de dicho factor de transcripción. También se ha visto que este enzima juega un papel clave en la diferenciación de los condrocitos articulares (Yang et al., 2013; Lawson et al., 2013). Del mismo modo, la pérdida en ratones de la histona metiltransferasa específica de H3K27, EZH2 (*Enhancer of zeste homolog 2*), ocasiona un retraso drástico en el crecimiento y una alteración en la proliferación de los condrocitos (Lui et al., 2016). La metilación de H3K27 mediada por DOT1L (*DOT1 like histone lysine methyltransferase*) parece estar implicada en la diferenciación condrogénica mediante la regulación de la vía de señalización de Wnt, pues el silenciamiento de dicho enzima reduce la condrogénesis y la mineralización de la matriz extracelular *in vitro* (Castaño-Betancourt., 2012; McLean et al., 2014).

En otras ocasiones, el reclutamiento de histona demetilasas como PHF2 (*PHD finger protein 2*) puede promover la expresión de genes implicados en la condrogénesis regulados por SOX9 (Hata et al., 2013). JMJD3 (*Jumonji domain containing-3*), una histona demetilasa específica de H3K27, se expresa notablemente tras la inducción por TGF- β de la condrogénesis en células madre mesenquimales y su cooperación con RUNX2 favorece la proliferación e hipertrofia de los condrocitos (Zhang et al., 2015; Yapp et al., 2016).

2.4.3.3 Modificadores de la cromatina

La diferenciación celular que tiene lugar durante el proceso de organogénesis de los embriones vertebrados es un evento muy complejo y ordenado en el que se producen múltiples y rápidos cambios en la expresión génica. Para ello, se debe regular la arquitectura de los nucleosomas, reducir la compactación de la fibra de ADN y modular la unión de los factores de transcripción o las modificaciones postraduccionales de las colas de las histonas. Estas son algunas de las funciones que ejercen las proteínas modificadoras de la cromatina pertenecientes a la familia HMG (Bustin., 2001; Lim et al., 2005). Estudios en diferentes modelos animales han puesto la atención en la relación existente entre los niveles de expresión de las proteínas HMGN y la diferenciación celular que ocurre durante el desarrollo embrionario, observándose una expresión célula-específica (Korner et al., 2003; Lehtonen y Lehtonen., 2001). Durante la formación de las extremidades, se puede advertir que la expresión de HMGN1 y HMGN2 está íntimamente relacionada con la diferenciación condrocítica, gracias a la modulación de SOX9. La asociación de estas proteínas genera un cambio estructural en la zona de la cromatina en la que se encuentra el gen *Sox9*, hecho que facilita su transcripción en un momento determinado del desarrollo (Furusawa et al., 2006). Del mismo modo, se ha descrito que la liberación por parte de los condrocitos hipertróficos de la placa de crecimiento de la proteína HMGB1 (*High mobility group box 1 protein*), miembro de la familia HMGB, actúa como un quimioatrayente favoreciendo la invasión de los osteoclastos, osteoblastos y células endoteliales (Taniguchi et al., 2007).

2.4.3.4 RNAs no codificantes

Los RNAs no codificantes interactúan con los complejos remodeladores de la cromatina para dirigirlos a las zonas específicas del genoma sobre las que han de actuar. Aunque en la presente tesis no se han descrito con detalle los microRNAs (miRNAs), en este apartado sobre la formación de las extremidades durante el desarrollo embrionario, es necesario hacer una breve mención. Compuestos por 21-24 nucleótidos, los microRNAs regulan la expresión génica a nivel postranscripcional mediante la represión de la traducción o la escisión de los RNAs mensajeros (mRNAs). A lo largo del proceso de condrogénesis participan en varios eventos como la formación y remodelación del cartílago o la regulación de la homeostasis celular (Zhang et al., 2012). Varios estudios han demostrado el papel que diversos miRNAs, como miR-410 o miR-146a, adquieren durante la diferenciación condrogénica (Guérit et al., 2013). Los ratones deficientes en miR-410, por ejemplo, presentan un deterioro en el crecimiento longitudinal de los huesos y una mayor diferenciación hipertrófica como consecuencia de su efecto sobre MEF2C (*Mads box transcription enhancer factor 2, polypeptide C*), un factor de transcripción que controla la hipertrofia de los condrocitos y el desarrollo óseo (Papaioannou et al., 2015; Zhou et al., 2015). Por otra parte, el bloqueo de la traducción de las proteínas SMAD2 y SMAD3, mediado por miR-146a, afecta a la diferenciación de las células esqueléticas y la reducción de miR-221 incrementa los niveles de marcadores condrogénicos durante la diferenciación de células madre mesenquimales (Cheung et al., 2014; Lolli et al., 2016).

Previo al proceso de apoptosis que inducirá la eliminación de las células presentes en el espacio interdigital, el tejido de dicho espacio sufre un periodo de senescencia caracterizado por un fenotipo secretor proinflamatorio (Lorda-Diez et al., 2015a, b). Con relación a este hecho, se ha descrito recientemente que dos miRNAs asociados con inflamación y senescencia, miR-21 o miR-146c, están sobreexpresados en las células presentes en el tejido interdigital del autopodio en desarrollo (Garcia-Riart et al., 2017). Por el contrario, en el transcurso de la regresión del tejido del espacio interdigital se observa una reducción en los niveles de expresión de miR-222a y miR-205, dos RNAs no codificantes implicados en proliferación e inhibición de la muerte celular (Garcia-Riart et al., 2017).

Del mismo modo que ocurre con los miRNAs, los RNAs largos no codificantes están implicados en la regulación del desarrollo de los elementos esqueléticos. HOTTIP controla el crecimiento y la elongación de las estructuras que componen el zeugopodio, parte media, y el autopodio, parte distal de la extremidad en desarrollo (Wang et al., 2011). Para ello, regula la expresión de los genes 5' HOXA mediante el reclutamiento de un complejo proteico que promoverá la metilación de la lisina 4 de la histona H3, marca epigenética de la cromatina activa (Schuettengruber et al., 2017). Asociado con los genes promotores de la condrogénesis, el lncRNA HIT recluta al complejo p100/CBP (*CREB-binding protein*) para modular la acetilación de H3K27 en los momentos previos a la diferenciación condrogénica (Carlson et al., 2015). El desarrollo musculoesquelético de las extremidades también está regulado por estas moléculas y un ejemplo de ello es el papel de H19 durante la diferenciación osteogénica. Este lncRNA actúa sobre la ruta de señalización TGF- β /pSmad3/HDAC4/HDAC5 potenciando la expresión de *Runx2* y *Ocn* (*Osteocalcine*) (Liu et al., 2017).

Como se ha tratado de explicar, la condrogénesis que ocurre durante el desarrollo embrionario de las extremidades es un proceso altamente regulado por distintos mecanismos epigenéticos. Todos ellos, interaccionan entre sí controlando, espaciotemporalmente, la formación de estas estructuras.

3. OBJETIVOS

El presente proyecto de Tesis Doctoral pretende caracterizar la implicación de alteraciones en la cromatina, como un paso previo al inicio de los procesos degenerativos que eliminan el tejido del espacio interdigital en las especies de vertebrados con dedos libres durante el desarrollo embrionario. Nuestro principal objetivo es generar un nuevo modelo que explique la amplia variedad de formas de degeneración celular que ocurren a lo largo de la remodelación de los tejidos embrionarios, durante los procesos de morfogénesis. En concreto nos proponemos contestar las siguientes cuestiones:

1. ¿Existen alteraciones en el ADN previas al inicio de la muerte en las células destinadas a morir? Las hipótesis en curso proponen que la muerte celular se origina por una cadena de señalización que se inicia en la mitocondria o la membrana celular y subsecuentemente se traslada al núcleo. Nuestra hipótesis es que las lesiones degenerativas del interdígito sean secundarias a un daño primario en el ADN de los progenitores esqueléticos que no reciben señal de diferenciación.
2. ¿Posee la cromatina de las células destinadas a morir una labilidad diferencial a las agresiones genotóxicas? Dado que aún desconocemos la causa primaria que origina la muerte celular programada, queremos averiguar si las células destinadas a morir poseen una configuración de la cromatina que las haga más susceptible a agentes endógenos, como el estrés oxidativo, o a otros agentes exógenos como las radiaciones ionizantes.
3. ¿Poseen las células que van a morir rasgos epigenéticos diferenciales con respecto a las que sobreviven y forman dedo? Para tratar de responder a esta cuestión, analizaremos los patrones de metilación del ADN en periodos previos y durante la muerte. Por el momento, descartamos un análisis detallado de otras modificaciones epigenéticas debido, a que en experimentos preliminares no se han obtenido diferencias significativas que justifiquen su estudio. Haremos un estudio sistemático tanto a nivel de expresión génica como proteica de los factores más relevantes implicados en la metilación del ADN. Aquellos cuya expresión se correlacione temporal y/o espacialmente con el proceso degenerativo serán elegidos para realizar estudios funcionales.

4. MATERIAL Y MÉTODOS

4.1 Modelos Animales

En la presente Tesis Doctoral se han empleado embriones de pollo Rhode Island (*Gallus gallus*) de 4.5 a 7.5 días post-incubación (PI), equivalente a los estadios 25 y 32 de Hamburger y Hamilton (25 y 32HH) (Hamburger y Hamilton., 1951); y embriones de ratón (*Mus musculus*) de la cepa C57BL6 de 10.5 a 14 días post coitum (pc). Los ratones se mantuvieron en el Servicio de Estabulación y Experimentación Animal (SEEA) de la Universidad de Cantabria rigiéndose, su cuidado y manipulación, por las normas de experimentación dictadas por la Comunidad Europea (2010/63/UE) de acuerdo con la vigente legislación española (Real Decreto 53/2013).

Los huevos se incubaron a 38.5°C y 50% de humedad relativa durante los días necesarios hasta que el embrión alcanzó el estadio considerado óptimo para el experimento que se quería realizar.

4.2 Obtención y Procesamiento del tejido biológico

4.2.1 Extracción del tejido embrionario del espacio interdigital

Para la realización de los experimentos se tomó, como tejido a estudio, el tercer y cuarto interdígito de los autopodios de los embriones de pollo y ratón, respectivamente.

En embriones de pollo, los estadios que se consideran adecuados para la disección del tejido interdigital comprenden desde el 28HH (corresponde a los 5.5 días PI y es previo al inicio de la muerte) hasta el 32HH (corresponde a los 7.5 días PI y coincide con el momento de muerte celular masiva). En ratón, se eligen embriones de estadios equivalentes a los del pollo, entre los 10.5 y 14 días pc. De esta forma, se puede abarcar todo el proceso de regresión del tejido interdigital y estudiar los diferentes mecanismos que tienen lugar en él.

Transcurrido el tiempo deseado de incubación, los huevos se sacan de la incubadora y se dejan reposar una hora a temperatura ambiente. Para su desinfección, se pulverizan con alcohol etílico al 70% y se procede a la extracción de los embriones, los cuales se depositan en una placa de Petri con PBS 1x estéril y frío a pH 7.4.

En el caso de los ratones, las hembras preñadas se anestesian con éter y se sacrifican para la extracción de sus embriones. Al igual que con los embriones de pollo, los de ratón se depositan en una placa de Petri con PBS 1x estéril.

Bajo estas condiciones, se diseccionan las patas del embrión y se transfieren a una nueva placa con PBS 1x, donde se procede a diseccionar el tejido presente en el espacio interdigital. Se utilizan para ello unas pinzas de relojero que nos permitirán fijar la pata por su parte dorsal para, con ayuda de un iridiotomo, realizar dos incisiones entre el tercer y cuarto dedo. En el caso de trabajar con autopodios de ratón, se corta el tejido del espacio interdigital localizado entre el cuarto y el quinto dedo. Una vez extraído el interdígito, y en función del tipo de experimento que se vaya a realizar, el tejido puede utilizarse al momento o congelarse a -80°C , para evitar que el ARN se deteriore.

4.2.2 Obtención de disociados celulares: Técnica del squash

Los experimentos de inmunofluorescencia se hicieron en disociados de progenitores mesodérmicos del espacio interdigital de autopodios de embriones de pollo, ya que esta técnica permite estimar con alta resolución y exactitud el número y tamaño, la localización nuclear y las asociaciones entre los diferentes compartimentos nucleares. En todos los casos, las muestras se fijaron previamente con paraformaldehído (PFA) (Merk) al 3.7% en PBS 2x.

En primer lugar, se disecciona el tejido del espacio interdigital y se deposita un pequeño fragmento en un portaobjetos (SuperFrost®Plus, Menzel-Gläser, Alemania). Sobre él se añaden 10 μl de PBS 1x, se coloca un cubreobjetos de 18 x 18 mm y por percusión, se van separando las células con ayuda de una aguja histológica. A continuación, se colocan los portaobjetos, con el cubreobjetos hacia abajo, sobre nieve carbónica durante 10 minutos. Pasado ese tiempo, el cubreobjetos se retira con una cuchilla y, empleando un lápiz con punta de diamante, se delimita la zona donde se han quedado fijadas las células. Los portaobjetos se sumergen en etanol frío al 96% durante 7 minutos y se almacenan a 4°C en PBS 1x hasta su uso.

4.2.3 Cortes Histológicos en Vibratomo

Los cortes histológicos se realizan utilizando patas de embriones de pollo y ratón fijadas, durante toda la noche a 4°C, en PFA al 3.7%. Tras varios lavados con PBS 1x, las muestras se pegan al molde del vibratomo (LEICA VT1000S) de forma que queden bien orientadas para realizar las secciones longitudinales o transversales del tamaño deseado, en nuestro caso 150µm. Con ayuda de un pincel, los cortes histológicos se recogen y se sumergen en PBS 1x para su posterior uso, siendo recomendable almacenarlos a 4°C.

4.2.4 Cultivos Celulares

4.2.4.1 Cultivos en alta densidad o micromasas

A partir de la extracción de progenitores mesodérmicos, aún indiferenciados, de la zona de progreso (PZ) de los autopodios de las extremidades de los embriones de pollo de 4.5 días PI (estadio 25 HH) se realizan cultivos *in vitro*. Para ello, se transfieren los embriones en una placa de Petri con PBS 1x y se pasan a una con medio de cultivo L-15 (*Leibovitz Medium*; Lonza) 1% penicilina/estreptomicina donde se procederá a la disección de la zona de progreso, parte más distal del autopodio.

Las células se obtienen mediante digestión enzimática, a 37°C y 5% de concentración de CO₂, con tripsina y colagenasa, ambas al 0.25% en L-15, durante 6 y 12 minutos, respectivamente. Para bloquear la acción de los enzimas, se cambia el medio por 1ml de DMEM (*Dublecco's Modified Eagle Medium*; Lonza) 1% penicilina/estreptomicina suplementado con FBS al 10% (*Foetal Bovine Serum*) y se pipetea con cuidado para disgregar el tejido. Tras añadir 9ml de L-15, las células se separan utilizando un filtro de 70µm MACS®SmartStrainers (MACS Miltenyi Biotec); el medio resultante se centrifuga a 1000 rpm durante 10 minutos. Llegados a este punto y en función del tipo de experimento que se quiera realizar el tiempo de incubación, a 37°C y 5% de CO₂, varía.

Las células centrifugadas se resuspenden en DMEM 10% FBS 1% penicilina/estreptomicina y se añaden a placas de cultivo “Nunclon™ Surface” (Nunc) de 48 pocillos a una concentración de 2.5×10^5 células/10 μ l; los pocillos exteriores se rellenan con PBS 1x. Durante 90 minutos, las placas se incuban a 37°C y 5% de concentración de CO₂; transcurrido ese tiempo, se añaden 200 μ l de medio DMEM 1% penicilina/estreptomicina con L-Glutamina a cada pocillo.

Bajo estas condiciones, las placas de cultivo se incuban el tiempo requerido para cada experimento; por ejemplo, para estudiar la formación de nódulos de cartílago, las células se suelen dejar en cultivo entre 3 y 5 días.

4.2.4.1.A Nucleofección de plásmidos y siRNAs

Tras la centrifugación en la que se obtienen las células, se añaden sobre el pellet de células 400 μ l de buffer isoosmolar de electroporación (Eppendorf) con el plásmido de interés por cada condición a estudio (control, experimental 1...). Esa mezcla se vierte en una cubeta de electroporación (Molecular BioProducts) y se introduce en el electroporador (Eppendorf Multiporator System). Las células electroporadas a 260V, 150 μ s y 4 pulsos se pasan a un eppendorf con 400 μ l de DMEM 1% penicilina/estreptomicina suplementado con FBS al 10% que se centrifuga durante 8 minutos a 1000 rpm. El pellet de células obtenido se resuspende en DMEM 10% FBS 1% penicilina/estreptomicina y se añaden a placas de cultivo “Nunclon” de 48 pocillos (Nunc) a una concentración de 4×10^5 células/10 μ l durante hora y media a 37°C y 5% de CO₂.

En la presente Tesis, los experimentos de ganancia de función se realizaron electroporando células con construcciones basadas en las secuencias codificantes de los genes de pollo *Dnmt3b* (*cDnmt3b*; OGa28523D), *Uhrf1* (*cUhrf1*; OGa47434) y *Uhrf2* (*cUhrf2*; OGa21255) clonadas en el vector de expresión pcDNA3.1 (GenScript). En los de pérdida de función, los progenitores mesodérmicos se electroporaron con ARNs de interferencia de horquilla corta (*short hairpin RNA interference*, *shRNAi*) clonados en un vector con promotor U6 de pollo, pcU6-1-shRNA (generosa donación del Dr. Tim J. Doran) que expresa los shRNAs de interferencia que actúan específicamente sobre *Dnmt3b* (*shDnmt3b*), *Uhrf1* (*shUhrf1*) y *Uhrf2* (*shUhrf2*).

La secuencia de estos shRNAs de interferencia se ha diseñado utilizando la plataforma “BLOCK-IT™ RNAi Designer” (ThermoFisher Scientific; <https://rnaidesigner.thermofisher.com/rnaiexpress>).

Como control negativo, en los dos tipos de experimentos, se electroporaron las células con los plásmidos vacíos. La concentración utilizada para los plásmidos de ganancia de función fue 1.5µg por cada 10⁶ células y para los de silenciamiento 2µg por cada 10⁶ de células.

4.2.4.1.B Tratamiento con inhibidores de DNMT

Para inducir una pérdida de metilación en los progenitores esqueléticos, las micromasas se tratan con dos inhibidores de las DNMTs, 5-azacitidina (A2385; Sigma-Aldrich) y RG108 (HB1377; Hello Bio), a una concentración de 20µM diluidos en DMSO; a las 24 y 72 horas de haber sido sembradas. Pasado ese tiempo se procesan de manera acorde al estudio que se quiera llevar a cabo.

4.3 Implantación de microesferas

En este estudio, la expresión ectópica de diversos factores de crecimiento y fármacos se llevó a cabo mediante la implantación de microesferas porosas, impregnadas en dichos compuestos, en el autopodio de embriones de pollo de 5.5 días PI (28HH). Las microesferas que se han utilizado son: acrílicas de tipo catiónico AG1-X2 (BioRad) y acrílicas en solución de heparina (Sigma).

Antes de la implantación, las microesferas han de ser incubadas durante una hora a 4°C en una cámara húmeda con la proteína recombinante o el compuesto químico que se quiera utilizar. Pasado ese tiempo, se realiza una ventana en la cáscara del huevo a nivel del polo romo y, con ayuda de unas pinzas, se retira con cuidado la membrana que separa la cáscara del albumen. Tras hacer una incisión en la membrana vitelina se accede al embrión, quien descansa de costado dejando su flanco derecho expuesto. Gracias a su accesibilidad, la microesfera se implanta haciendo un pequeño orificio con una aguja de tungsteno en el tercer interdígito de la extremidad inferior de dicho costado.

Finalizada la manipulación quirúrgica, el huevo se sella con cinta adhesiva y se incuba a 40°C en posición vertical durante el tiempo deseado. Transcurrido ese periodo, se extraen los embriones y se diseccionan las extremidades en una placa de Petri con PBS 1x; las muestras se procesan de manera acorde al estudio que se quiera llevar a cabo.

4.4 Modelos Experimentales de Radiación Ionizante

Con el fin de inducir un daño exógeno en el ADN de las células de los embriones de pollo, se utilizó un sistema generador de rayos-X (Maxishot-d, Yxlon Int, USA) equipado con un tubo que emite un rayo, con una tasa de absorción de 0.9 Gy/min a 200mKv y 4.5mV. Para ello, los huevos se colocaron en una plataforma a 25cm del tubo y se radiaron para administrar una dosis única de entre 1 y 4Gy. Tras incubar los huevos durante el tiempo deseado, se extrajeron los embriones y se procesaron según el posterior estudio que se quería realizar.

4.5 Técnicas de Biología Celular

4.5.1 Marcaje para la detección de la actividad de la β -galactosidasa

La senescencia celular se puede evaluar mediante la detección de la actividad de la β -galactosidasa en cortes histológicos de autopodios fijados en glutaraldehído al 4%.

Las muestras se lavan con PBS-MgCl₂ a pH 6 y se incuban, en oscuridad, a 37°C con la solución fijadora X-Gal durante varias horas. Es importante monitorizar la reacción y controlar la aparición de un precipitado azul verdoso que se corresponde con el marcaje positivo. Para parar la reacción, basta con hacer varios lavados con PBS 1x. Tras colocar los cortes sobre un portaobjetos con glicerol al 50% en PBS 1x, las muestras se fotografiaron en una lupa Nikon SMZ1500 provista de una cámara digital Nikon DXM1200C utilizando el software Nikon ACT-1C.

4.5.2 Tinción del tejido esquelético con Azul Alcian

El azul alcian es un colorante utilizado para el análisis de los fenotipos esqueléticos, pues pone de manifiesto el cartílago. Para ello, las muestras se fijan a 4°C en ácido tricloroacético (TCA) al 5% en solución Ringer durante toda la noche. Posteriormente, se pasan a la solución colorante azul alcian al 1% en alcohol ácido, donde se dejan en agitación y a temperatura ambiente hasta el día siguiente. Pasado ese tiempo, se realizan dos lavados de 30 minutos y dos de una hora, a temperatura ambiente y en agitación, con alcohol ácido y con etanol absoluto (Panreac), respectivamente. Para terminar, las muestras se transparentan con metilsalicilato (Fluka). En nuestro caso, se fotografiaron, utilizando el software Nikon ACT-1C, en una lupa Nikon SMZ1500 provista de una cámara digital Nikon DXM1200C.

4.5.2.1 Tinción con azul alcian de los cultivos de micromasas

Los cultivos de progenitores mesodérmicos, procedentes del autopodio del embrión de pollo, crecidos bajo condiciones de alta densidad se tiñeron con azul alcian para analizar su capacidad de formar nódulos cartilaginosos. Después de 5 días de cultivo, las células se fijan 20 minutos con Fijador de Khale's y se tiñen durante 24 horas con azul alcian al 0.5% en alcohol ácido. Para retirar el exceso de colorante, se realizan varios lavados con HCl 0.1N y con PBS 1x; tras ellos, las micromasas se fotografían.

En algunas ocasiones los niveles de condrogénesis se cuantificaron mediante la extracción del colorante azul alcian con guanidina-HCl 6M a pH 5.8. La densidad óptica de las muestras se midió a 600nm con un espectrofotómetro.

4.5.3 Detección de la muerte celular con el colorante vital Rojo Neutro

Con el fin de poner de manifiesto el patrón de muerte celular que se produce durante el desarrollo embrionario se utiliza el colorante vital rojo neutro. Para ello, los autopodios se tiñen con rojo neutro 0.2N en PBS 1x al 0.2% a 37°C durante 15-20 minutos. Pasado ese tiempo, las áreas de muerte adquieren una tonalidad rojiza.

4.6 Técnicas de Microscopía Confocal

4.6.1 Inmunofluorescencia

4.6.1.1 Inmunofluorescencia en disociados celulares

Los portaobjetos con los disociados celulares del interdígito se incuban en glicina 0.1M durante 20 minutos con el fin de eliminar los grupos aldehído restantes que han quedado en las muestras tras la fijación. Seguidamente, se permeabilizan entre 45-90 minutos con PBS-Triton X-100 al 0.5% a temperatura ambiente y en agitación; se lavan con PBS 1x y PBS-Tween 20 al 0.05% (PBST- 0.05%) y se incuban con 10µl del anticuerpo primario deseado diluido en PBS 1x. Los anticuerpos específicos utilizados aparecen enumerados en la tabla 1.

Los portaobjetos se pueden incubar varias horas a temperatura ambiente o durante toda la noche a 4°C en una cámara húmeda y en oscuridad. Tras retirar los restos de anticuerpo con PBS 1x y PBST-0.05%, las preparaciones se incuban en oscuridad durante 45 minutos, en una cámara húmeda a temperatura ambiente con un anticuerpo secundario conjugado con un fluorocromo (Jackson ImmunoResearch Laboratories, Inc.). En el caso de que se quieran inmunodetectar varias proteínas a la vez, las muestras se incuban de manera independiente con los anticuerpos primarios y se revelan con anticuerpos secundarios específicos y con distintos fluorocromos.

Para su observación al microscopio confocal láser, las muestras se impregnan con el medio de montaje Vectashield (Vector Laboratories, Peterborough) y sobre ellas se coloca un cubreobjetos que será sellado con laca de uñas.

El microscopio confocal láser utilizado, Zeiss LSM 510, cuenta con tres líneas de láser: argón (488nm), HeNe (543 nm) y HeNe (633nm); para excitar, respectivamente, FITC, TxRd y Cy5.

Anticuerpo	Especie	Referencia y casa comercial
γ H2AX	Ratón	JBW301, Millipore-Upstate
	Conejo	AP0099, ABclonal
Rad50	Conejo	O7-1781, Millipore
MDC1	Conejo	Ab41951, Abcam
53BP1	Conejo	A300-272A, Bethyl Lab., Inc.
ATM fosforilada	Ratón	#4526, Cell Signaling
Sox9	Conejo	AB5535, Millipore
UHRF1 (D6G8E)	Conejo	#12387, Cell Signaling
UHRF2	Conejo	TA337863, OriGene
	Ratón	Sc-398953; Santa Cruz Biotechnology
DNMT1	Conejo	NB100-26455; NovusBio
DNMT3a	Conejo	Ab2850; Abcam
	Conejo	Ab188470; Abcam
DNMT3b	Conejo	Ab2851; Abcam
5-metilcitosina (5-mC; 33D3)	Ratón	Eurogentec

Tabla 1. Listado de los anticuerpos utilizados para los ensayos de inmunofluorescencia.

4.6.1.1.A Detección de la metilación del ADN

Para la detección de la metilación del ADN mediante microscopía confocal láser es necesario fijar las muestras con una solución compuesta por PFA (Merk) al 3.7%, HEPES 1x a pH 6.9 y Triton X-100 al 0.5% durante una hora a temperatura ambiente. Pasado ese tiempo, el material fijado se lava con HEPES 1x y PBS 1x; en este último buffer se disecciona el tejido de interés.

Una vez obtenidos los disociados celulares, según el protocolo descrito en el apartado 4.2.2, se incuban durante 20 minutos a temperatura ambiente con HCl 4N y Triton X-100 al 0.1% para desnaturalizar su ADN. Tras 6 lavados de 6 minutos cada uno con Tris 50mM a pH 8, las preparaciones se incuban durante 2 horas a 4°C con Tris 50mM a pH 8 en BSA (*Bovine Serum Albumins*) al 1%.

Terminado el bloqueo, se realizan 2 lavados de 5 minutos con Triton X-100 al 0.5%, se incuba con 10µl del anticuerpo primario anti 5-metilcitosina (5-mC) y se prosigue como si se tratase de una inmunofluorescencia convencional.

4.6.1.2 Inmunofluorescencia en cortes histológicos de vibratomo

El protocolo para detectar inmunofluorescencia en cortes de vibratomo difiere un poco del mencionado anteriormente. En primer lugar, los cortes se permeabilizan con PBS-Triton X-100 al 0.1% y se bloquean durante una hora a temperatura ambiente con BSA al 4% en PBS-Triton X-100 al 0.1%. A continuación, se añade el anticuerpo primario y se incuban las muestras con él, toda la noche a 4°C y en agitación. Transcurrido ese tiempo, se realizan de 3 a 5 lavados de 20 minutos cada uno con PBS-Triton X-100 al 0.1% y se incuban los cortes con el anticuerpo secundario, toda la noche a 4°C en agitación y oscuridad. Después de varios lavados con PBS 1x, las muestras se depositan en un portaobjetos con Vectashield (Vector Laboratories) para su observación al microscopio confocal láser.

4.6.1.3 Inmunofluorescencia en cultivos de alta densidad o micromasas

Los progenitores mesodérmicos disociados del autopodio de la extremidad, siguiendo el protocolo descrito en el apartado **4.2.4.1**, se incuban sobre un cristal colocado en el pocillo de la placa de cultivo al que se le han añadido 7µl de fibronectina (1mg/ml). Después de unos días y en función del tipo del experimento que se quiera realizar, las micromasas se fijan con PFA al 3.7% a temperatura ambiente durante 30 minutos. Tras lavar con cuidado, los cristales se disponen en una placa de Petri y, creando una cámara húmeda, se permeabilizan las células con 2 lavados de 15 minutos de PBS-Triton X-100 al 0.1%.

Se enjuagan de nuevo los cristales con PBS 1x y se incuban con 10µl del anticuerpo primario 3 horas a temperatura ambiente o toda la noche a 4°C. Pasado ese tiempo, se lavan con PBS 1x para retirar los restos de anticuerpo y se incuban con el anticuerpo secundario o con otro anticuerpo primario dependiendo de si se va a realizar una inmunohistoquímica simple o doble, respectivamente.

Terminada la incubación, los cristales se lavan con PBS 1x, se secan bien y se les añade una gota de medio de montaje Vectashield (Vector Laboratories, Peterborough). A la hora de montar la preparación se debe tener en cuenta que las células han de quedar en contacto con el portaobjetos, actuando, el cristal sobre el que han crecido, como cubreobjetos.

4.6.2 Detección de la muerte celular mediante TUNEL

Para la detección *in situ* de células apoptóticas se utiliza el ensayo TUNEL (*Terminal transferase-mediated dUTP Nick End Labeling*) (Roche), basado en la adición de dUTP nucleótidos a los extremos 3' libres del ADN fragmentado por medio del enzima terminal deoxinucleotidil-transferasa.

Las muestras se incuban a 37°C con una solución compuesta por un buffer (Tris 30mM a pH 7.2; cacodilato de sodio 140mM; cloruro de cobalto 1mM y Triton X-100 al 0.3%) y por el enzima (2µl/ml) encargado de catalizar esta reacción. El tiempo de incubación difiere en función del tipo de muestras, siendo 15 minutos para disociados celulares y una hora para cortes histológicos.

4.7 Técnicas de Biología Molecular

4.7.1 Obtención de sondas antisentido para hibridación *in situ*

Con el fin de analizar los dominios de expresión de un grupo de genes se realizaron hibridaciones *in situ* en patas de embriones de pollo y ratón. Un paso previo a este estudio es la obtención de una sonda de ARN antisentido que hibride específicamente con el RNA mensajero (mRNA) de nuestro gen a estudio.

4.7.1.1 Diseño de oligonucleótidos cebadores para PCR

En nuestro grupo de investigación, se diseñan los cebadores con ayuda de la herramienta Primer3 incluida en el programa informático *Sequence Analysis v.1.7.2* y se verifica su eficiencia, en la página web “*The Sequence Manipulation Suite*” (<http://www.bioinformatics.org/sms2>), con el fin de evitar la formación de horquillas y fenómenos de autohibridación. Para comprobar que la región flanqueada por los cebadores elegidos era específica de nuestro gen, se alinea su secuencia con la del gen a estudio en la página web BLAST, realizando un análisis nBLAST (*nucleotic Basic Local Aligment Search Tool*; (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/blast.cgi>)).

La región del gen que se amplifica por PCR fue de aproximadamente unas 500 pares de bases (pb). En la siguiente tabla 2 se muestran los oligonucleótidos utilizados.

Gen	Especie	Primer	
		Sentido (5´-3´)	Antisentido (5´-3´)
<i>Dnmt1</i>	Pollo	GAGGACTGCAACGTTCTGC	TGCTGACGAACTTCTTGTCG
<i>Dnmt3a</i>	Pollo	GAGAGAGGCGGAGAAGAAGG	TGTCAGTCTCGTCGTTCTCG
<i>Dnmt3b</i>	Pollo	ACGAAGATGGCTACCACTCC	TCTTGGTGATGTTCTGACG
<i>Uhrf1</i>	Pollo	TCCACATCTATTGCCTCAACC	GAACACCAGATTCGCTCACC
	Ratón	TGACTCTGGCTATGGTGTGG	GCCTGATGTTGCCGTATAGC
<i>Uhrf2</i>	Pollo	AGAGTTCAGGTGAGCGAAGC	AGGCTCAACGTCATCTCTCC
	Ratón	AGAGTTCAGGTGAGCGAAGC	TCGTTGATTCTTCTGAGG

Tabla 2. Listado de cebadores para PCR utilizados para la obtención de sondas antisentido.

4.7.1.2 PCR

La reacción en cadena de la polimerasa (*Polymerase Chain Reaction, PCR*) permite amplificar un fragmento deseado de ADN con ayuda de unos primers (sentido y antisentido; Invitrogen Custom DNAoligos). El ADN complementario (cDNA) empleado en la PCR procede de muestras control de extremidades inferiores, en concreto de autopodios, de embriones de pollo de entre 4 y 7 días PI.

Cada tubo de PCR, de forma independiente, contiene un volumen total de 50µl compuesto por:

- 45µl de mix (sus componentes aparecen en la tabla 3).
- 5µl de cebadores específicos a una concentración 10µM para cada gen (2.5 µl del oligonucleótido en sentido 5´-3´ y 2.5µl del cebador antisentido 3´-5´).

Reactivos	Volumen
Agua destilada Milli-Q (Merck Millipore)	33 µl
PCR buffer 10x libre de Mg	5 µl
MgCl ₂ 50mM	1.5 µl
Mix dNTPs 10mM	1 µl
ADN	4 µl
Taq ADN polimerasa (Fermentas)	0.5µl

Tabla 3. Componentes del mix para PCR.

La PCR consta de un primer ciclo de 3 minutos a 94°C seguido por entre 25 y 35 rondas de desnaturalización (45 segundos a 94°C), hibridación (30 segundos a 55°C) y síntesis (45 segundos a 72°C; 90 segundos/ kb). Dicha reacción termina con un ciclo de extensión de 10 minutos a 72°C. Los fragmentos amplificados mediante PCR se analizan por electroforesis, a 100V durante aproximadamente 45 minutos, en un gel de agarosa al 1% (TopVision Agarose Tablets; ThermoScientific) en TBE 0.5%.

A la solución resultante de la PCR se le añaden 4.5µl de RedSafe™ (INtRON); un intercalante del ADN que permite la observación de las bandas de nuestro fragmento al introducir el gel en un transiluminador de luz ultravioleta Gel-Doc con software de fotografiado Quantity One (BioRad). Para determinar su tamaño en pares de bases, las bandas se comparan con las del marcador MassRuler DNA Ladder (Fermentas).

4.7.1.3 Extracción de bandas y ligación

Los fragmentos de ADN amplificado se purifican a partir del gel de agarosa siguiendo el protocolo del kit de extracción “Illustra™ GFX™ PCR DNA and Gel Band Purification” (GE Healthcare Life Sciences) y se liga, durante toda la noche a 4°C, a un plásmido pGEM®-T Easy Vector System (Promega) para su clonación.

La inserción del ADN amplificado en el vector de interés se produce gracias a la complementariedad existente entre los extremos 3'; los del plásmido presentan residuos deoxitimidina y los del ADN residuos deoxiadenosina, añadidos durante la PCR por la Taq ADN polimerasa. Los reactivos requeridos para dicho proceso se muestran en la tabla 4.

Reactivos	Volumen
Buffer de Ligación 2x	5 µl
Plásmido pGEM-T Easy	1 µl
ADN amplificado	3.5 µl
T4 DNA ligasa	1 µl

Tabla 4. Componentes necesarios para realizar la ligación del ADN amplificado al plásmido pGEM-T easy.

4.7.1.4 Transformación de la cepa DH5alfa de *Escherichia coli*

La clonación del plásmido con nuestro fragmento de ADN amplificado se lleva a cabo mediante la transformación, por choque térmico, de la cepa DH5alfa de *Escherichia coli* (Invitrogen). Para ello, las células competentes se incuban durante 30 minutos con 6µl del ADN ligado al plásmido. Transcurrido ese tiempo, se introducen durante 2 minutos en un baño a 42°C y se pasan a hielo durante otros 2 minutos. Se añaden 500µl de medio SOC y se incuban las células en agitación una hora a 37°C. Posteriormente, se añaden 4µl de IPTG 0.1M al cultivo y por extensión, se siembra en placas de LB agar (Invitrogen) tratadas con ampicilina (100 µg/ml) y 15µl de X-gal.

Tras pasar la noche a 37°C, se observan dos tipos de colonias bacterianas: unas blanquecinas, que serán las que presenten el plásmido insertado en el gen LacZ; y otras azuladas, con capacidad para sintetizar β-galactosidasa y sin inserto.

Se seleccionan individualmente las colonias que han adquirido el inserto, las blancas, y se siembran en 3ml de medio líquido LB Broth (Invitrogen) suplementado con ampicilina (100 µg/ml). Dicho medio de cultivo se incuba en agitación a 37°C durante toda la noche.

4.7.1.5 Purificación del ADN plasmídico de las bacterias transformadas

Para la purificación del ADN plasmídico presente en las DH5alfa se sigue el protocolo del kit de extracción “Miniprep High Pure Plasmid Isolation” (Roche) y tras ella, el plásmido purificado se digiere con el enzima de restricción EcoRI (Fermentas).

La presencia de sitios diana para dicho enzima a ambos lados del lugar de inserción permite la liberación del fragmento de ADN; confirmando que la ligación y posterior transformación han sido satisfactorias. La solución compuesta por los reactivos presentados en la tabla 5 se digiere a 37°C durante, como mínimo, hora y media.

Reactivos	Volumen
ADN plasmídico purificado	3.5 µl
Buffer EcoRI	2 µl
Enzima EcoRI	1 µl
Agua Milli-Q (Merck Millipore)	13.5 µl

Tabla 5. Composición de la solución para la digestión del ADN plasmídico purificado mediada por EcoRI.

Una vez digerido se realiza una electroforesis, a 100V y durante 30 minutos, en un gel de agarosa al 1% (TopVision Agarose Tablets; ThermoScientific). Aquellos plásmidos que han liberado el inserto son secuenciados para verificar la identidad del gen y para conocer su orientación en el vector (STABVIDA).

4.7.1.6 Digestión y Linealizado del ADN plasmídico

Para linealizar el plásmido debemos elegir aquellos enzimas de restricción que corten el vector en el sitio adecuado en función del promotor de transcripción que vayamos a utilizar posteriormente. Es importante que el sitio de corte no esté comprendido dentro del inserto, de ahí que se elijan aquellos enzimas que realicen el corte antes o después de nuestro fragmento de interés.

La digestión tiene lugar en una solución compuesta por 5µl de ADN plasmídico, 1µl de la enzima de restricción elegida, 2µl de tampón de digestión específico para la enzima y 12µl de agua Milli-Q (Merck Millipore) a 37°C durante como mínimo 3 horas. Mediante una electroforesis en un gel de agarosa al 1% (TopVision Agarose Tablets; ThermoScientific) se verifica si la linealización ha sido correcta.

4.7.1.7 Purificación del plásmido linealizado

El siguiente paso, en la obtención de una sonda antisentido, es la purificación del plásmido que se ha linealizado siguiendo los pasos mencionados en el apartado anterior. Para ello, se añade al volumen resultante de la digestión 2µl de acetato sódico 3M y 50µl de etanol absoluto y se incuba a -20°C toda la noche. Al día siguiente, la mezcla se centrifuga durante 20 minutos a 12000 rpm y 4°C; se lava con 250µl de etanol frío al 70% y se centrifuga de nuevo 5 minutos. Tras retirar el sobrenadante, el ADN linealizado se deja secar y se resuspende en agua Milli-Q (Merck Millipore).

4.7.1.8 Transcripción y purificación de la sonda

La conversión del ADN en ARN se lleva a cabo a 37°C durante, como mínimo, 2 horas en una solución compuesta por 10µl de ADN, procedente del plásmido linealizado, y 10 µl de un mix cuyos componentes se muestran en la tabla 6.

Reactivos	Volumen
RNA MIX Labeling Digoxigenina 10x (Roche)	3 μ l
Buffer de Transcripción 5x (Fermentas)	4 μ l
RNA polimerasa (20 U/ μ l) (Fermentas)	2 μ l
Inhibidor de RNAsas (Fermentas)	1 μ l

Tabla 6. Componentes del mix necesario para realizar la transcripción.

La RNA polimerasa requerida para realizar la transcripción depende de la orientación del inserto en el plásmido ya que, como se ha mencionado varias veces a lo largo del apartado **4.7.1** el objetivo final del mismo es la obtención de una sonda de RNA antisentido. En nuestro caso se han utilizado las RNAs polimerasas T7 y SP6, ya que el vector utilizado (pGEM®-T Easy; Promega) incluye estos dos promotores.

Para comprobar que la transcripción ha sido correcta, se realiza una electroforesis en gel de agarosa al 1% (TopVision Agarose Tablets; ThermoScientific) a 50V durante 30 minutos. Si el resultado es satisfactorio se añaden 3 μ l de tRNA (Yeast RNA), 100 μ l de TE a pH 8, 12 μ l de acetato sódico 3M y 300 μ l de etanol absoluto a la mezcla fruto de la transcripción. Dicha solución se guarda 2 horas a -20°C y, pasado ese tiempo, se centrifuga a 4°C durante 20 minutos a 12000 rpm. Después de retirar el sobrenadante, se añade 1ml de etanol frío al 70% y se centrifuga bajo las mismas condiciones 10 minutos. El pellet se deja secar y se resuspende en 30 μ l de agua libre de RNAsas; la sonda antisentido para nuestro gen de interés se guarda a -20°C.

4.7.2 Hibridación *in situ*

La técnica de hibridación *in situ* permite analizar los patrones de expresión que presentan, en nuestro modelo, diferentes genes de interés. En esta Tesis, se han utilizado patas de embriones de pollo y ratón fijadas con PFA al 3.7%.

Dichas muestras se lavan con PBST-0.01% y se incuban durante una hora, en oscuridad y agitación, con una solución compuesta por peróxido de hidrógeno (H_2O_2) al 6% en PBST-0.1% para blanquear las piezas y eliminar restos de sangre.

Después de varios lavados con PBST-0.1%, las muestras se colocan en un baño a 20°C para permeabilizar con una solución de proteinasa K (10 µg/ml; Roche) en PBST-0.1% durante aproximadamente 27 minutos. Este paso es crítico para que la hibridación sea satisfactoria, por tanto, se debe monitorizar la temperatura para controlar que sea constante. El tiempo en dicho buffer depende del tipo de muestra que se utiliza y de la efectividad de la sonda. A continuación, se lavan de nuevo con PBST-0.1% y se vierte sobre las muestras una mezcla de PFA al 3.7% con glutaraldehído al 0.25% (Sigma); 20 minutos a temperatura ambiente será el tiempo que tengan que estar embebidas en dicha solución. Acto seguido, las muestras se lavan con PBST-0.1% y se incuban durante una hora en un baño a 65°C con un buffer de hibridación. Pasado ese tiempo se añade la sonda marcada con digoxigenina específica para nuestro gen de interés, a una concentración 1:200 en buffer de hibridación, y se incuba toda la noche en un baño a 67°C.

Tras retirar la sonda, las muestras se lavan durante 2 horas (2 lavados de 1 hora) con el buffer I a 65°C y con la solución III durante 10 minutos a temperatura ambiente. A continuación, se incuban las muestras con la solución III durante 30 minutos y a 65°C para posteriormente, realizar tres lavados de 10 minutos a temperatura ambiente con TBST 2mM. Una vez que se han retirado los restos de sonda que no ha hibridado, se inicia el proceso de marcaje con un anticuerpo anti-digoxigenina (Roche) que lleva conjugado el centro catalítico de la fosfatasa alcalina (AP). En primer lugar, las muestras se bloquean durante una hora con suero (Lamb serum, Gibco) al 10% en PBST-0.1%, durante una hora a temperatura ambiente y en agitación. Transcurrido ese tiempo, se incuban hasta el día siguiente, a 4°C y en agitación, con un anticuerpo anti-digoxigenina (1/2000; Roche) diluido en una solución de suero (*Lamb serum*, Gibco) al 10% en PBST-0.1%.

Para limpiar los restos de anticuerpo, se hacen 5 lavados de 40 minutos cada uno, a temperatura ambiente y agitación, con TBST 2mM Levamisol (Sigma) seguidos de 2 lavados de 15 minutos con NTMT. Una vez que las muestras ya se han lavado se procede al revelado de la hibridación añadiendo BM Purple AP substrate (Roche); es importante monitorizar la reacción hasta la aparición de un marcaje positivo de color violeta.

Para parar la reacción se retira el líquido de revelado y se lavan las muestras varias veces con NTMT. Después de unos cuantos enjuagues rápidos con PBS 1x, las muestras están listas para ser observadas y fotografiadas. En nuestro caso hemos utilizado una lupa Nikon SMZ1500 provista de una cámara digital Nikon DXM1200C.

4.7.2.1 Hibridación *in situ* en cortes histológicos de vibratomo

Para realizar una hibridación *in situ* en cortes histológicos de vibratomo se sigue el protocolo mencionado en el apartado 4.7.2 con varias modificaciones: la primera de ellas, es que se debe acortar el tiempo de tratamiento con la proteinasa K (20 minutos a 20°C), y la segunda, que la duración de los lavados es menor.

4.7.3 Análisis de la expresión génica por PCR cuantitativa

4.7.3.1 Extracción del ARN total

Siguiendo las indicaciones del kit “NucleoSpin RNA” (Macherey-Nagel) se extrae el ARN de muestras de tejido interdigital de diferentes estadios de edad y de cultivos de micromasas. La concentración y pureza de las muestras se cuantifica mediante la lectura de su absorbancia a 260nm y 280nm en un espectrofotómetro (Nanodrop Technologies ND-1000).

4.7.3.2 Transcripción reversa o Retrotranscripción de ARN

Mediante la retrotranscripción se obtiene el ADN complementario (cDNA) a las hebras de ARN purificadas según se ha mencionado en el apartado anterior. Para ello, se sigue el protocolo descrito en el kit “RevertAid RT” (Thermo Fisher Scientific).

La reacción, llevada a cabo en un termociclador (Biorad), consta de una incubación de 10 minutos a 25°C, un ciclo de 60 minutos a 42°C y otro de 10 minutos a 70°C.

Tras ella, la concentración de cDNA se cuantifica utilizando un espectrofotómetro (Nanodrop Technologies ND-1000) y se ajusta a 0.5µg/µl con agua estéril Milli-Q (MerckMillipore).

4.7.3.3 PCR cuantitativa (qPCR)

Gracias a esta técnica se pueden cuantificar los cambios en la expresión de determinados genes de interés y comparar los resultados de las muestras experimentales con los de las control. La cuantificación de ADN de doble cadena se lleva a cabo utilizando un compuesto orgánico, SYBR Green (SYBR Select Master Mix; Life Technologies), que se asocia a la hebra de ADN y que emite fluorescencia ($\lambda_{em} = 520nm$) cuando se excita con una luz polarizada ($\lambda_{exc} = 497nm$). El aumento en la intensidad de la fluorescencia es proporcional a la concentración de ADN de doble cadena; es decir, a la cantidad de producto de PCR generado.

4.7.3.3.A Diseño de oligonucleótidos para PCR cuantitativa

Los cebadores empleados para cuantificar los niveles de expresión génica mediante qPCR con SYBR Green (SYBR Select Master Mix; Life Technologies) se diseñan con ayuda del programa informático *Sequence Analysis v.1.7.2*. Posteriormente, se verifica su eficiencia en la web “*The Sequence Manipulation Suite*” (<http://www.bioinformatics.org/sms2>) y, mediante un análisis nBLAST (nucleotide Basic Local Alignment Search Tool; <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/blast.cgi>), que sean específicos del gen de interés.

Los oligonucleótidos utilizados en esta tesis para analizar los niveles de expresión génica por qPCR con SYBR Green (SYBR Select Master Mix; Life Technologies) se muestran en la tabla 7.

Gen	Especie	Primer	
		Sentido (5'-3')	Antisentido (5'-3')
<i>Bim</i>	Pollo	TTCAATGCCTCCTATTGTCC	TGAGGCGGATGATGTAATGC
<i>Bmf</i>	Pollo	TGGTTACCGCTTACATGTCC	GCAATCTGCACCTCAGTACG
<i>Bid</i>	Pollo	CAAGAGAAGGCCATGTTGG	ACAGTGGTGCTGAAGACACG
<i>Bcl2</i>	Pollo	TTGTACGGCAACAGTATGAGG	ATAAGCGCCAAGAGTGATGC
<i>Bak1</i>	Pollo	CTACGTCACCGAATTCATGC	AACATTGTCCAGATCGAGTGC
<i>Dab2</i>	Pollo	CACAGCCAGCACAAGTTCC	TGAGCAGGTAGCGTTGAAGG
<i>Fibrillin2</i>	Pollo	CGAGTGTGCAACAGAAGAGC	GAAGCCATCTCCATTGAAGC
<i>Gapdh</i>	Pollo	GGTGGCCATCAATGATCC	GTTCTCAGCCTTGACAGTGC
<i>Hmgn1</i>	Pollo	TGCCGAAGAGAAAGGTGGCCG	CCAACGCCTTAGCTTTAGGCTCCG
<i>Ltbp1</i>	Pollo	TGAGTGCTGTTGCTTGATGG	GAACAGGAATGTTGCACAGC
<i>p21</i>	Pollo	CGTAGACCACGAGCAGATCC	CGTCTCGGTCTCGAAGTTG
<i>Rpl13</i>	Pollo	AACTCAAGATGGCAACTCAGC	AAGGCCTTGAAGTTCTTCTCC
<i>Scleraxis</i>	Pollo	CACCAACAGCGTCAACACC	CGTCTCGATCTTGGACAGC
<i>SnoN</i>	Pollo	ACCTGCCTCCTATCCAGAGC	CCACCTCTTGCAAGATGAGC
<i>Sox9</i>	Pollo	GAGGAAGTCGGTGAAGAACG	GATGCTGGAGGATGACTGC
<i>Tgfβ2</i>	Pollo	TGCACTGCTATCTCCTGAGC	GCATGAACTGATCCATGTGC
<i>Tgfβr1</i>	Pollo	GTTATTGCTGGACCTGTCTGC	TCTTCTTCACTTGGCACACG
<i>Tgfβr2</i>	Pollo	ACCGCACTCACAAGAAGAGG	GTTGATGTTGTTGGCACAGG
<i>Tgif1</i>	Pollo	CTCTCCTACCACGAGGATGC	GTGCAACATCCACCAGTAGC
<i>Uhrf1</i>	Pollo	CATCATCACGGAGAGACTGG	CAGGAATTGGTCCGTAGTGG
	Ratón	CGTGCGTGACAATATCTTCG	CATCCTCCGAGGTCTTAACG
<i>Uhrf2</i>	Pollo	CTGTGTTGGTCGCACTAAGG	GTCTGTGAACACCTGCTTCG
	Ratón	TTGGACCTCAGAAGGAATCG	CCTTGGTCTTCTTGCTTCC

Tabla 7. Cebadores empleados en qPCR.

4.7.3.3.B PCR cuantitativa a tiempo real (qPCR-RT)

Para cada muestra a estudio se añade 1µl de cDNA, 9µl de una solución compuesta por 8.2µl de agua Milli-Q (Merck Millipore) y 0.4µl de cada cebador (sentido y antisentido) para el gen de interés y 10µl de SYBR Green (SYBR Select Master Mix; Life Technologies). Estos 20µl totales se dividen en dos tubos de 10µl, obteniendo así para cada muestra dos duplicados.

La qPCR a tiempo real se realiza en un sistema termociclador específico con accesorio de automatización Mx3005P (Stratagene) que cuenta con un software de análisis MxPro (Stratagene), bajo las siguientes condiciones:

1. Un ciclo de desnaturalización durante 10 minutos a 95°C.
2. 40 ciclos compuestos por 30 segundos a 95°C, 1 minuto a 60°C (anillamiento) y 30 segundos a 72°C (elongación).
3. Un ciclo final formado por 1 minuto a 95°C, 30 segundos a 55°C y 30 segundos a 95°C.

En esta técnica, se marca un umbral de fluorescencia (*threshold*) en el punto en el que la reacción de amplificación se encuentra en fase exponencial; el ciclo en el que la amplificación alcanza dicho umbral recibe el nombre de C_T (*threshold cycle*) y depende de la cantidad de cDNA. La fluorescencia emitida por el complejo ADN-SYBR Green se mide al final de cada ciclo de anillamiento y en el último ciclo, en concreto en la subida de temperatura de 55°C a 95°C cada 0.5°C. Estas últimas medidas son necesarias para realizar la curva de disociación que permite comprobar la especificidad de la reacción.

4.7.3.3.C Cuantificación y análisis de la expresión génica

Los resultados se obtienen con el programa informático Stratagene MXPro software versión 3.0 (Stratagene) y para normalizarlos, se utiliza como control interno el gen RPL13 para muestras de interdígito y GAPDH para muestras de micromasas. Los valores para cada gen se han obtenido por duplicado. Para calcular el nivel de expresión relativo de los genes de interés en las muestras experimentales con respecto a las muestras control se utiliza la ecuación $2^{-\Delta\Delta C_t}$ (Livak y Schmittgen; 2001). Cada valor representa la media de 3 muestras independientes obtenidas en las mismas condiciones.

Los resultados se someten a los análisis estadísticos t-Student o ANOVA (con prueba de Bonferroni como test post-hoc) según corresponda. Se considera que un resultado es estadísticamente significativo cuando su p-valor es $p < 0.05$.

4.7.4 Estudio de proteínas por Western Blot (WB)

La inmunodetección por WB de proteínas requiere la obtención de lisados celulares totales; en esta Tesis, las muestras proceden de interdígitos de distintos estadios de edad que se almacenan a -80°C hasta el momento de su uso.

Para la preparación de las muestras se emplea un tampón de lisis específico compuesto por NETN, benzonasa 500mM ($1\mu\text{l}/\text{ml}$; Novagen) e inhibidores de proteasas (1:100; Roche). Tras añadir dicho reactivo, las muestras se lisan físicamente utilizando un politrón (Pellet Pestle® Cordless Motor; Kimble) hasta obtener un extracto homogéneo y se incuban 30 minutos a 4°C . Pasado ese tiempo, se centrifugan a 14000 rpm durante 10 minutos a 4°C y se recoge el sobrenadante para la cuantificación de las proteínas mediante el método de Lowry (Lowry et al., 1951). Las muestras se incuban con un tampón de carga 2x durante 5 minutos a 95°C y se cargan en un gel de poliacrilamida-SDS para su posterior electroforesis vertical. El porcentaje total de acrilamida/bisacrilamida del gel determina el rango de separación de las proteínas, en este caso se han utilizado geles del 12%. La electroforesis se realiza, a 130V y durante 90 minutos, en un Mini-Protean II (BioRad) con tampón de electroforesis.

A continuación, las proteínas se transfieren a una membrana de PVDF (*Polyvinylidene difluoride*) con ayuda de un Mini-Protean II (Biorad) durante 90 minutos a 100V; se utiliza para ello un tampón de transferencia. La membrana se lava con TBST, se bloquea una hora a temperatura ambiente con TBST-BSA al 5% y se incuba, durante toda la noche a 4°C y en agitación, con el anticuerpo primario diluido en TBST-BSA al 2%. Al día siguiente, se retira el anticuerpo, se lava la membrana con TBST y se incuba con el anticuerpo secundario, diluido en TBST-BSA al 2%, durante una hora a temperatura ambiente, en agitación y oscuridad.

Tras lavar la membrana varias veces con TBST, la señal de los anticuerpos se detecta utilizando el sistema Odyssey Infrared Imaging System (Li-Cor). Como proteína normalizadora se ha utilizado GAPDH.

Anticuerpo	Especie	Referencia y casa comercial
UHRF1 (D6G8E)	Conejo	#12387, Cell Signaling
UHRF2	Conejo	TA337863, OriGene
	Ratón	Sc-398953; Santa Cruz Biotechnology
DNMT1	Conejo	NB100-26455; NovusBio
DNMT3a	Conejo	Ab2850; Abcam
	Conejo	Ab188470; Abcam
DNMT3b	Conejo	Ab2851; Abcam
GAPDH	Mouse	Sc-32233; Santa Cruz Biotechnology
IRDye680/800DX anti-IgG	Ratón	Rockland Immunochemicals
IRDye680/800DX anti-IgG	Conejo	Rockland Immunochemicals

Tabla 8. Listado de los anticuerpos utilizados en los WB.

4.7.5 Análisis por Citometría de flujo

Esta técnica permite obtener información de una población celular a partir de un estudio individualizado de un grupo de células. En la presente tesis, la citometría de flujo se utiliza para analizar el ciclo celular y los niveles de muerte de los progenitores esqueléticos en los que se han llevado a cabo los experimentos funcionales.

Después de 48 horas en cultivo, las micromasas se incuban con 200µl de tripsina-EDTA (Lonza) 3 minutos a 37°C y 5% CO₂ con el fin de disociar las células. A continuación, se añaden 200µl de DMEM 1% penicilina/estreptomina suplementado con FBS al 10% y se recogen en un tubo de citometría; éste se centrifuga a 1500 rpm durante 5 minutos y a 4°C. El pellet se lava con PBS 1x, se centrifuga de nuevo y se fija en etanol absoluto una hora a 4°C. 60 minutos después, las células se centrifugan durante 5 minutos a 1500 rpm y a 4°C, se lavan con PBS 1x y se vuelven a centrifugar.

Para marcar el ADN, se añaden sobre el pellet 250µl de yoduro de propidio (IP; 1mg/ml) disuelto en una solución compuesta por citrato sódico al 1%, Triton X-100 al 0.1% y PBS 1x. Las células se incuban durante toda la noche en oscuridad y a 4°C; al día siguiente se analizan en un citómetro Cytoflex (Beckman Coulter) utilizando el software Cytexpert.

4.7.6 Extracción de ADN genómico

Utilizando el kit “NucleoSpin®Tissue” (Macherey-Nagel) se extrajo ADN genómico procedente de tejido interdigital y de punta de dedo del autopodio de embriones de entre 5.5 días (28HH) y 7.5 días (32HH) PI. En algunas ocasiones también se utilizaron micromasas de progenitores mesodérmicos de dos días de cultivo sometidas a experimentos de ganancia y pérdida de función. La concentración y pureza de cada una de las muestras se cuantifica por espectrofotometría (Nanodrop Technologies ND-100).

4.7.7 Evaluación de la metilación global del ADN

Los niveles de metilación global se determinaron mediante el kit “Imprint® Methylated DNA Quantification” (MDQ1; Sigma-Aldrich, St. Louis MO, USA) a partir de 150ng de ADN genómico procedente de tejido interdigital y de punta de dedo del autopodio de embriones de entre 5.5 días (28HH) y 7.5 días (32HH) PI. También se utilizó ADN genómico de micromasas de 2 días de cultivo transfectadas con plásmidos para silenciar o potenciar la expresión de los genes *Dnmt3b*, *Uhrf1* y *Uhrf2*; así como el de aquellos cultivos tratados con los inhibidores de las DNMTs. Siguiendo las indicaciones del fabricante, las muestras se incubaron con los anticuerpos de captura y detección. Los niveles de metilación global se calcularon en base a la absorbancia de las muestras, medida a una longitud de onda de 450nm, a partir de la siguiente fórmula:

$$\frac{(A450av \text{ Muestra} - A450av \text{ Blanco})}{(A450av \text{ ADN Control metilado} - A450av \text{ Blanco})} * 100$$

4.7.8 Análisis de la metilación del ADN mediante qPCR asociada a enzimas de restricción sensibles a metilación (MSRE-qPCR)

El grado de metilación del promotor de determinados genes, implicados en nuestro modelo a estudio, se analizó mediante qPCR asociada a enzimas de restricción sensibles a metilación (*Methylation-sensitive restriction enzymes*, MSRE-qPCR).

En primer lugar, se localizan las islas CpG existentes en el gen utilizando la plataforma virtual “*Genome Browser*” del Instituto de Genómica de la Universidad de California en Santa Cruz (<https://genome-euro.ucsc.edu/index.html>). Tras obtener la secuencia de la isla CpG presente en el promotor del gen de interés, se diseña una pareja de oligonucleótidos capaces de amplificar una porción de esa región utilizando el software online *Primer3Plus* (<http://www.bioinformatics.nl/cgi-bin/primer3plus/primer3plus.cgi>) (Tabla 9).

Gen	Especie	Primer	
		Sentido (5´-3´)	Antisentido (5´-3´)
<i>Sox9</i>	Pollo	CCATCACGCTCACACTCTC	AGGTACCGCTGTAGGTGGTG
<i>Scx</i>	Pollo	CTGTACCCCGAGATCAGCAT	GGTGTTGACGCTGTTGGTG
<i>p21</i>	Pollo	GCTATAAAGGGCGGAGTGC	CCATCACCCCTCTTTCC
<i>Bak1</i>	Pollo	AGCTGCAGCCTTCCCAGA	CTCTAGAGGCGCCTTGAC

Tabla 9. Oligonucleótidos utilizados para la amplificación de una región determinada del promotor de los genes de interés que se muestran en la tabla.

Con ayuda de la página web “*RestrictionMapper versión 3*” (<http://www.restrictionmapper.org>) se seleccionan dos tipos de enzimas de restricción:

- Enzimas de restricción CONTROL, no sensibles a metilación: presentan un sitio de corte en la secuencia del promotor. En la presente tesis se han empleado *SacI* (10U/μl; ER1132 Thermo Fisher Scientific) y *HphI* (10U/μl; ER1102 Thermo Fisher Scientific).
- Enzimas de restricción SENSIBLES a la metilación de CpG: reconocen su secuencia de corte siempre y cuando no esté metilada. Para los experimentos de esta tesis se han utilizado *TauI* (3U/μl; ER1651 Thermo Fischer Scientific) y *FauI* (200U/μl; R0651S; New England BioLabs).

Una vez que el diseño del experimento se ha llevado a cabo, se añaden 15μl de ADN genómico de las muestras, 2μl de los enzimas y 2μl del buffer de restricción correspondiente. Se completa con agua Milli-Q (Merck Millipore) hasta alcanzar un volumen total de 20μl y se digieren las muestras durante 2 horas a la temperatura de acción del enzima.

Para la PCR cuantitativa se hacen triplicados de las muestras con un volumen total de 20µl por tubo, cada de ellos contiene 1µl de ADN genómico digerido, 0.4µl de cada cebador (sentido 5' - 3' y antisentido 3' - 5'), 8.2µl de agua Milli-Q (MerckMillipore) y 10µl de SYBR Select Master Mix (Life Technologies).

La qPCR se realiza en un termociclador "StepOnePlus™ Real-Time PCR System" y se analiza con el software de análisis "StepOne software v2.3 (Life Technologies) bajo las siguientes condiciones:

1. Un ciclo de desnaturalización durante 10 minutos a 95°C.
2. 45 ciclos compuestos por 15 segundos a 95°C, 1 minuto a 60°C (anillamiento) y 30 segundos a 72°C (elongación).
3. Un ciclo final formado por 1 minuto a 95°C, 30 segundos a 55°C y 30 segundos a 95°C.

El porcentaje relativo de ADN metilado se calcula a partir de la ecuación $2^{-\Delta\Delta Ct}$ utilizando como normalizadores los valores de las Ct de las muestras digeridas con los enzimas de restricción control.

4.8 Soluciones Utilizadas

4.8.1 PBS 1x

Se disuelve en agua NaCl 137mM; KCl 2.7mM; Na₂HPO₄ 10mM; KH₂PO₄ 1.75mM y se ajusta el pH a 7.4.

4.8.2 Técnicas de Biología Celular

4.8.2.1 Solución Fijadora

Compuesta por PBS-MgCl₂; KC 20x y X-Gal 20x (B 6024, Sigma-Aldrich) disueltos en DMSO.

4.8.2.2 Solución Ringer

Compuesta por NaCl 120mM; KCl 5.6mM y CaCl₂ 2.16mM.

4.8.2.3 Fijador de Khale's

Para prepararlo se necesitan 100ml de ácido acético glacial (Panreac), 150ml de etanol 95% (Panreac), 60ml de formol (Panreac) y 300ml de agua estéril.

4.8.3 Técnicas de Microscopía Confocal

4.8.3.1 Inmunofluorescencia

4.8.3.1.A HEPES 2x

En 200ml de agua destilada se disuelven 9g de Pipes Sal disódico (Sigma) 130mM, 2.86g de HEPES 60mM, 0.16g de MgCl₂*6H₂O 4mM y 1.52g de EGTA 20mM. La solución se filtra y se ajusta el pH a 6.9.

4.8.4 Técnicas de Biología Molecular

4.8.4.1 Electroforesis

4.8.4.1.A TBE 0.5%

Se disuelven en 5 litros de agua destilada 27g de Tris y 13.76g de ácido bórico, se añaden además 10ml de EDTA 0.5M a pH 8.

4.8.4.2 Hibridación *in situ*

4.8.4.2.A Buffer de hibridación

Se mezclan 5ml de formamida, 2.5ml de SSC 20x a pH 7, 1ml de SDS 10%, 50µl de tRNA (10mg/ml), 10µl de heparina (50mg/ml) y se enrasa con agua destilada hasta alcanzar un volumen final de 10ml.

4.8.4.2.B Solución I

Para tener un volumen final de 25ml se mezclan 12.5ml de formamida, 5ml de SSC 20x a pH 4.5, 2.5ml de SDS 10% y se enrasa con agua destilada.

4.8.4.2.C Solución III

Se mezclan 25ml de formamida, 5ml de SSC 20x a pH 4.5 y 20ml de agua destilada.

4.8.4.2.D TBST Levamisol 2mM

Para un volumen final de 100ml se añaden 5ml de Tris-HCl 1M a pH 7.5, 3ml de NaCl 5M, 1ml de KCl 1M, 1ml de Tritón X-100, 1ml de Levamisol 200mM y se enrasa con agua destilada.

4.8.4.2.E NTMT

Se mezclan 10ml de Tris-HCl 1M a pH 9.5, 5ml de $MgCl_2$ 1M, 2ml de NaCl 5M, 1ml de Tween-20 al 10% y 0.5ml de Levamisol 200mM; se completa con agua destilada para tener un volumen final de 100ml.

4.8.4.3 Western Blot (WB)

4.8.4.3.A NETN

Para preparar 50ml de este buffer de lisis se necesitan 20ml de Tris-HCl 50mM a pH 8, 1.5ml de NaCl 5M, 100 μ l de EDTA 0.5M y 28.4ml de agua.

4.8.4.3.B Tampón de carga 2x

Compuesto por 1ml de Tris 1M pH 6.8, 800 μ l de β -mercaptoetanol 5%, 4ml de SDS al 10%, 0.01g de azul de bromofenol y 2ml de glicerol.

4.8.4.3.C Tampón de electroforesis

Para preparar un volumen final de un litro se requieren 100ml de Tris-Glicina 10x (30.29g de Trizma Base; 136.68g de Glicina y 900ml de agua), 10 ml de SDS 10% y agua destilada.

4.8.4.3.D Tampón de transferencia

En un litro de agua se disuelven 0.84g de $NaHCO_3$, 0.32g de Na_2CO_3 y 200ml de metanol.

4.8.4.3.E TBST

20ml de Tris 1M a pH 7.5 (31.75g Tris-HCl, 5.9g Tris-Base y 250ml de agua destilada), 30ml de NaCl 5M (146.25g de NaCl en 500ml de agua destilada), 500μl Tween-20 y agua destilada se necesitan para tener un volumen final de un litro.

5. RESULTADOS

5.1 Estudio de la secuencia de degeneración celular que tiene lugar durante la regresión tisular del espacio interdigital

Los mecanismos responsables del proceso de muerte celular que tienen lugar durante la regresión del tejido del espacio interdigital en las extremidades en formación de los tetrápodos permanecen en gran medida sin aclarar. Si bien con el paso de los años se han identificado diversos mecanismos capaces de alterar la homeostasis de los progenitores mesodérmicos indiferenciados que en él se encuentran, aún no se han conseguido aclarar por completo las señales que inician su proceso de apoptosis. Aparte de la posible implicación de procesos autofágicos, en estas células se observa un bloqueo de la proliferación celular, característico de la senescencia celular, y alteraciones en el citoesqueleto que contribuyen a la fragmentación nuclear y citoplasmática típica de la apoptosis. En las primeras fases de la degeneración, las células del espacio interdigital pierden sus prolongaciones citoplasmáticas como consecuencia de la degradación de los filamentos de actina (Lorda-Diez et al., 2011). La pérdida de adhesión con la matriz extracelular parece afectar a la correcta viabilidad celular y posiblemente influye en su catastrófico destino (Lorda-Diez et al., 2015). Asimismo, la regresión del tejido del espacio interdigital va acompañada de un aumento local de los niveles de especies reactivas de oxígeno que podrían actuar como disparadores de la muerte celular (Eshkar-Oren et al., 2015).

En nuestro trabajo hemos identificado la aparición, previa a la activación de las caspasas que conduce a la muerte celular por apoptosis, de roturas en el ADN de las células del tejido presente en el espacio interdigital (Montero et al., 2016). Estas roturas, se identifican por estar asociadas con la inducción de una respuesta para subsanar dicho daño (DDR) fruto del reclutamiento de la forma fosforilada de la histona H2AX (γ -H2AX) conocida por ser una proteína sensora al daño (Fernandez-Capetillo et al., 2004). Como se aprecia en la figura 12, en los estadios previos al inicio de la degeneración (en torno al día 6 PI) se observaba un marcaje positivo para γ -H2AX en el espacio interdigital (Figura 12C); cuando la región es aún negativa a la tinción vital con rojo neutro (Figura 12A) y al incremento de la actividad β -galactosidasa (Figura 12B), que son considerados indicadores canónicos de muerte celular y senescencia, respectivamente.

Sin embargo, a medida que avanzaba el desarrollo embrionario los tres tipos de marcajes se extendían por la zona interdigital (Figura 12D-F). En esta región las roturas de ADN, positivas para γ -H2AX, presentaban un área de distribución más amplia en comparación con los otros marcajes.

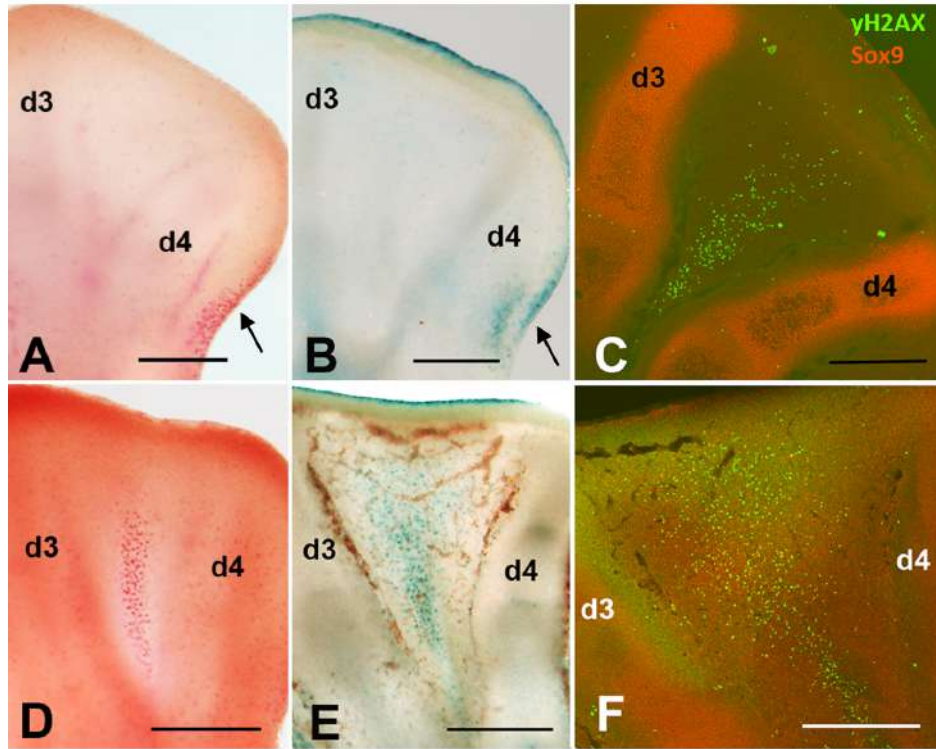


Figura 12. Eventos observados durante la regresión del tejido del espacio interdigital en el autopodio de embriones de pollo de 6 (A-C) y 7 días PI (D-F). En todas las imágenes se muestran los dedos 3 (d3) y 4 (d4) para delimitar el territorio del tercer espacio interdigital; en (C) y (F) ambas estructuras se han marcado con Sox9, para la detección del cartílago. La presencia de células positivas para γ -H2AX en el tejido del espacio interdigital de los embriones más jóvenes sugiere que la rotura del ADN es el primer evento del proceso de degeneración. En el día 6 PI, sólo la zona necrótica posterior (PNZ) muestra signos de senescencia y apoptosis, como indican las flechas de las imágenes A y B. Sin embargo, 24 horas más tarde, la muerte (D) y la senescencia celular (E) en el espacio interdigital se hacen visibles; en ese momento las células positivas para γ -H2AX se distribuyen por todo el interdígito (F). Escala: 200 μ m.

Al estudiar, de manera más detallada, el proceso de eliminación del tejido del espacio interdigital pudimos apreciar la existencia de una secuencia de degeneración caracterizada por la presencia de 3 tipos de células. Las positivas para γ -H2AX, con roturas en el ADN, eran predominantes en los días 6 y 6.5 PI; mientras que las células apoptóticas, identificadas gracias al ensayo TUNEL, predominaban en las etapas finales del proceso, cerca del día 7.5 PI.

En la figura 13 se puede observar cómo el porcentaje de células γ -H2AX decrecía significativamente a medida que el desarrollo avanzaba, disminución que iba acompañada de un incremento notable de células apoptóticas. A lo largo de esta transición también se encontraron, en el tejido del espacio interdigital, células mixtas positivas para ambos marcajes (Fig. 13).

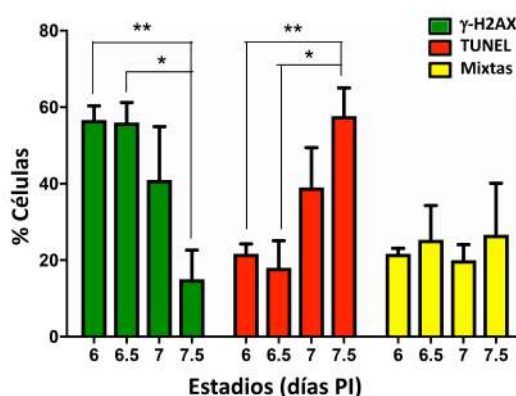


Figura 13. Porcentaje de células, presentes en el tercer espacio interdigital del autopodio de embriones de pollo de 6, 6.5, 7 y 7.5 días PI, positivas para γ -H2AX, TUNEL y para ambos marcajes. ** $p < 0.01$; * $p < 0.05$.

En su conjunto, los datos mostrados hasta el momento indican que el primer paso en el proceso de la regresión del tejido presente en el espacio interdigital es la aparición de roturas en el ADN de las células que lo componen. Por ello, analizamos el patrón y la localización nuclear de estas roturas mediante el inmunomarcaje de la forma fosforilada de la H2AX. Los focos positivos para γ -H2AX eran muy numerosos y de pequeño tamaño, estaban bien definidos y se distribuían por todo el núcleo; sin embargo, en algunas células su número disminuía a la vez que se incrementaba su tamaño. Con frecuencia, tras la rotura de la hebra de ADN se inicia una rápida respuesta coordinada que parece tratar de restablecer la organización del ADN y que cuenta con una serie de mediadores; los cuales en algunas ocasiones pueden ser degradados, posteriormente, por la acción de las caspasas que intervienen durante el proceso apoptótico (Solier y Pommier., 2011; Sharma et al., 2012). En las células del tejido interdigital se pudo verificar, con microscopía confocal, la colocalización de varios factores implicados en la reparación del daño en el ADN junto con la γ -H2AX. Esta asociación, mostrada en la figura 14 mediante inmunohistoquímica, se apreciaba en los estadios iniciales del proceso de regresión y se iba perdiendo a medida que el remodelado tisular avanzaba.

Dado que la quinasa ATM en su forma activa, la ATM autofosforilada (pATM), es imprescindible para la fosforilación de la H2AX tras la rotura de la doble hebra de ADN, nos pareció importante analizar su expresión y localización nuclear. La co-inmunodetección de pATM y γ -H2AX demostró la existencia de focos de daño positivos para ambos tipos de marcaje (Fig. 14A-A''). También se observó la relación directa entre los focos de γ -H2AX y otras proteínas implicadas en la DDR, como MDC1, Rad50 o 53BP1 (Fig. 14B-B'', C-C'' y D-D''). Esta última proteína juega un papel clave en la reparación al disponerse en el foco de la lesión para reclutar al complejo reparador de la vía NHEJ (Callen et al., 2013).

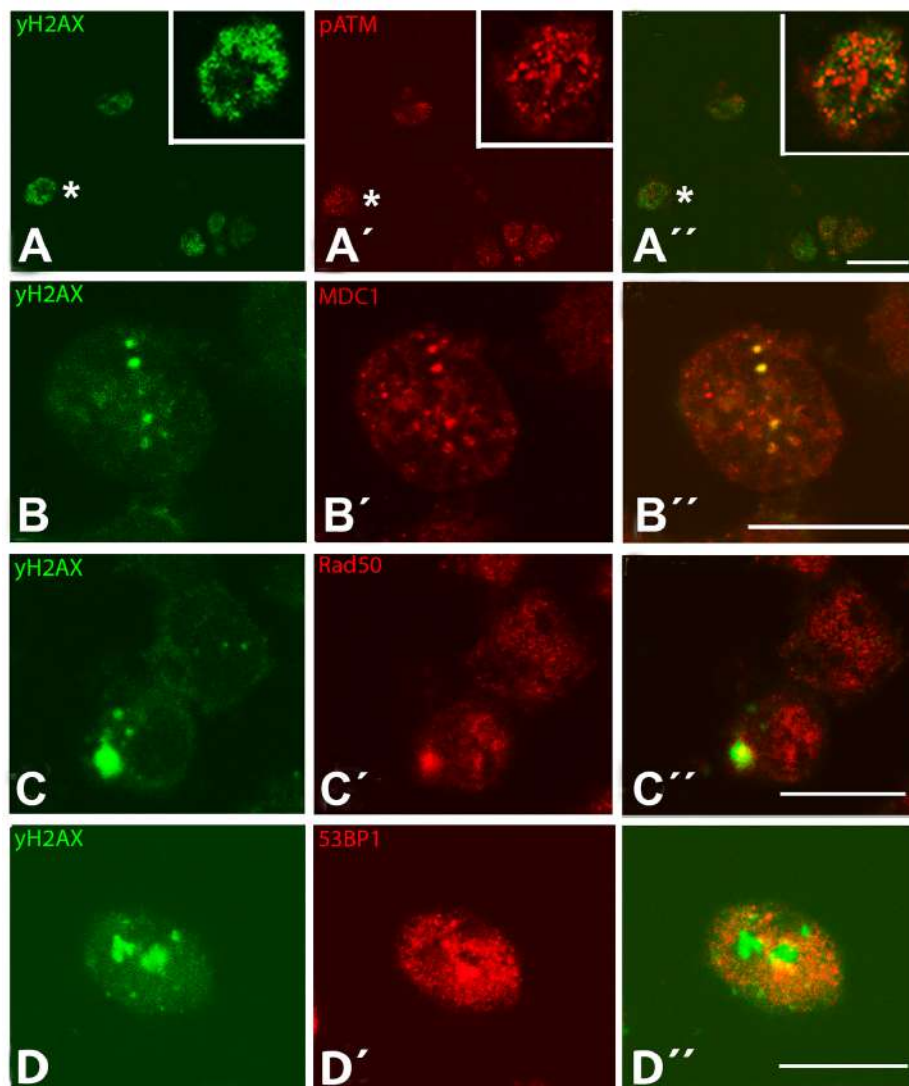


Figura 14. Células del mesodermo interdigital de embriones de ratón de 13.5 pc y de pollo de 6 días inmunomarcadas con γ -H2AX (verde) en combinación con diferentes factores implicados en la reparación del daño en el ADN (rojo): pATM (A'), MDC1 (B'), Rad50 (C') y 53BP1 (D'). Los recuadros muestran en detalle la célula señalada con el asterisco. Escala: 5 μ m.

La presencia de focos nucleares enriquecidos en γ -H2AX y proteínas implicadas en la DDR hace pensar que estas zonas pueden corresponder a sitios de daño del ADN generados espontáneamente. Por el contrario, la aparición de células apoptóticas, en etapas más tardías del proceso de regresión, sugiere una gran deficiencia reparadora del ADN que puede ser consecuencia de un retraso en la reparación o de un fracaso en la ligación de los extremos por la vía de reparación NHEJ. La vía de reparación NHEJ es propensa a introducir errores en la secuencia de ADN y puede ser la responsable de la acumulación de alteraciones irreversibles y/o deleciones que pueden comprometer la estabilidad genómica y afectar a secuencias génicas codificantes de proteínas (Pannunzio et al., 2018). Este potencial impacto en la expresión de proteínas puede tener efectos nocivos para las células, alterando su fisiología celular y promoviendo su eliminación por apoptosis.

Puesto que de forma fisiológica se observaba una degeneración de las células del tejido del espacio interdigital previa a su eliminación, nos pareció interesante comprobar si la inhibición o la inducción exógena de muerte, desencadenaban la misma secuencia degenerativa. Para ello, se colocaron en el tejido del tercer espacio interdigital del autopodio de embriones de pollo de 5.5 días PI microesferas impregnadas en varios compuestos. El bloqueo de la muerte celular, como consecuencia de la implantación de una microesfera embebida en un inhibidor de las caspasas, producía un notable incremento del número de células con roturas en el ADN respecto a las células TUNEL positivas (Fig. 15B-B'). Del mismo modo, tras la inducción de muerte mediada por los BMPs o tras la aplicación local de peróxido de hidrógeno se observaba una amplia población de células positivas para γ -H2AX en el tejido circundante a la bola que eran reemplazadas por células apoptóticas, TUNEL positivas, a tiempos más largos (Fig. 15C-C'' y D-D'').

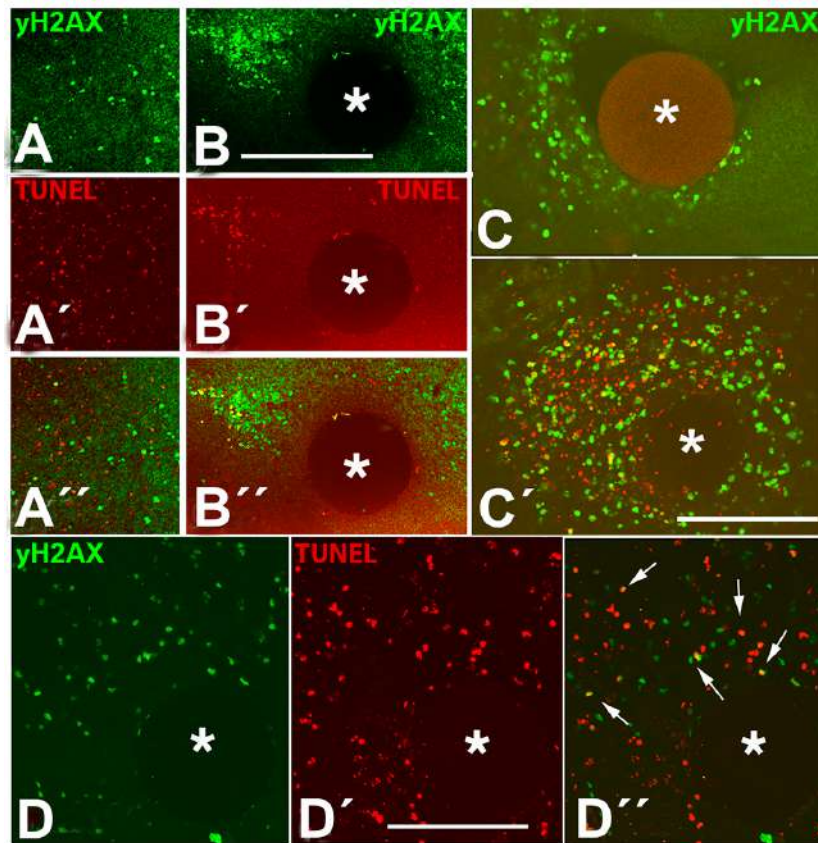


Figura 15. Distribución de células positivas para γ -H2AX y TUNEL en el mesodermo interdigital tras la implantación, en el autopodio de embriones de pollo de 5.5 días PI, de microesferas (señalizadas con *) impregnadas en un inhibidor de las caspasas (B), en BMP (C) y en agua oxigenada (D). La situación control está reflejada en la imagen A. La inhibición de las caspasas bloquea la señal de muerte (B') apreciándose un notable incremento de las células con daño en el ADN (B). A las 3 horas de la implantación de la microesfera impregnada en BMP la mayoría de las células en torno a ella son γ -H2AX positivas (C); 6 horas más tarde se observan células mixtas (color amarillo) y células apoptóticas (TUNEL positivas) (C'). También se observa una secuencia de degeneración celular alrededor de la bola impregnada en peróxido de hidrógeno (D). Las flechas señalan los 3 tipos celulares identificados: células γ -H2AX positivas, apoptóticas y mixtas (D''). Escala: 200 μ m.

Dada la sensibilidad a las roturas de ADN que presentaban los progenitores esqueléticos del tejido del espacio interdigital, decidimos estudiar si esta fragilidad era específica de los interdígitos o si también se daba en otras regiones del autopodio. Para llevar a cabo esta aproximación, sometimos a los embriones de pollo de 5.5 días PI a dosis subletales de radiación ionizante, entre 1-4 Gy, con el fin de generar lesiones en su ADN. En estos tratamientos con rayos X la intensidad, la distribución espacial y el ratio entre células con daño en el ADN y en apoptosis eran dosis y tiempo dependientes.

En las primeras 6 horas tras la radiación, se observaban células γ -H2AX en el tejido de los espacios interdigitales (Fig. 16A) pero también en las articulaciones en formación (Fig. 16B-B') y el mesodermo subapical (Fig. 16E) de los autopodios embrionarios. A tiempos más largos, en todas estas regiones donde también ocurren procesos fisiológicos de muerte, las células con daño en el ADN eran reemplazadas por células TUNEL positivas (Fig. 16A, C y D). Por el contrario, los radios digitales parecían no ser sensibles a la radiación, aunque a altas dosis (4Gy) algunas de las células dispuestas en sus márgenes sucumbían a la lesión.

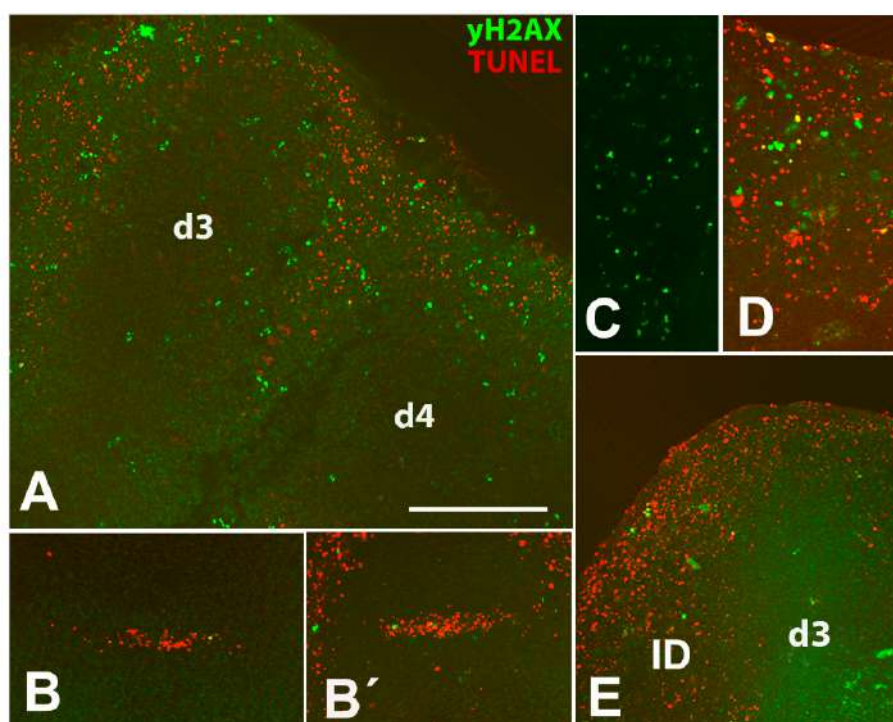


Figura 16. Tras la inducción de daño en el ADN de embriones de pollo de 5.5 días PI mediante radiación ionizante se aprecian zonas del autopodio con una mayor sensibilidad, positivas para γ -H2AX (A). En las primeras 6 horas, se localizan células γ -H2AX positivas en el tejido del espacio interdigital que más tarde son reemplazadas por células apoptóticas, TUNEL positivas. Esta secuencia puede apreciarse en los detalles del tercer espacio interdigital mostrados en (C) y (D). La radiación también tiene efectos sobre las articulaciones interfalángicas (B) y el mesodermo subapical (E). d3 y d4 señalan los radios digitales, negativos para los marcajes de daño en el ADN y apoptosis. Escala: 200 μ m.

Si bien los autopodios radiados con 1 y 2Gy presentaban un fenotipo esquelético normal, la secuencia de degeneración observada a nivel celular tras radiar con 3 y 4Gy derivaba en alteraciones esqueléticas como braquidactilia, reducción o, incluso, ausencia de articulaciones interfalángicas (Fig. 17).

El hecho de que las regiones condrogénicas del autopodio fuesen negativas para los marcajes de daño y apoptosis sugiere que la diferenciación y la muerte celular son dos destinos opuestos de los progenitores mesodérmicos que se excluyen entre sí, como las dos caras de una misma moneda.

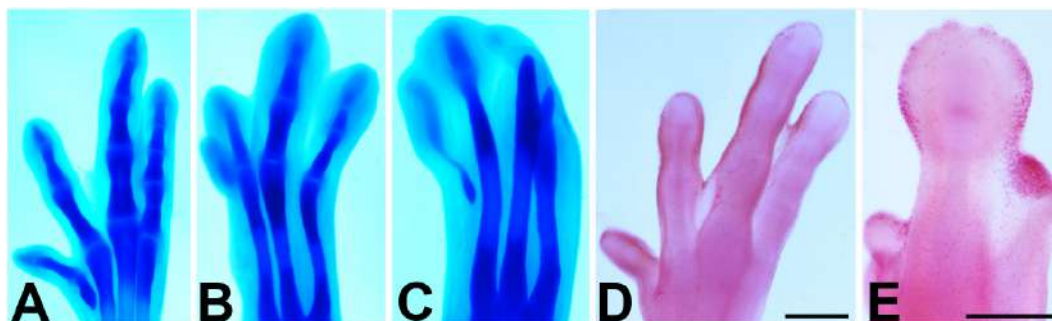


Figura 17. Efectos de la radiación, 3Gy (B) y 4Gy (C Y E) sobre el fenotipo de los autopodios de 5.5 días PI. La condrogénesis de los progenitores esqueléticos se ve afectaba tras la radiación con 3 (B) y 4Gy (C); llegando a ocasionar la pérdida de articulaciones. Tras la radiación ionizante las áreas de muerte se intensifican ocasionando, en algunos casos, la truncación de los dedos (E). En A y D pueden observarse autopodios control. Escala: 200 μ m

Con el fin de detectar si la sensibilidad a la radiación es una característica específica de las células interdigitales o si se trata de un fenómeno general, analizamos el comportamiento frente a la radiación de otras zonas del embrión donde se producen, de forma fisiológica, fenómenos de muerte celular. En la zona necrótica posterior (PNZ) y en la cresta ectodérmica apical (AER), áreas de intensa muerte celular presentes en el autopodio a lo largo del desarrollo de la extremidad, encontramos la misma secuencia de degeneración descrita anteriormente respecto a la inducción de células con roturas en el ADN, células TUNEL positivas y células mixtas (Fig. 18A y B). La misma respuesta fue también apreciada en las regiones del esbozo cardíaco, en las que la muerte celular participa de manera fisiológica en el esculpido del órgano, incluyendo los esbozos de las válvulas (Fig. 18C) y el tracto de salida de las grandes arterias (Fig. 18D). Como se puede apreciar en la figura 17, esas regiones con células dañadas también presentaban células senescentes con actividad β -galactosidasa (Fig. 18E y F). Esta asociación, entre el daño en el ADN y la senescencia, se ha descrito en numerosas ocasiones y se postula que puede ser consecuencia de un “*feedback*” dinámico en el que el estado senescente es promovido por las especies ROS, generadas durante la reparación del ADN (Hernandez-Segura et al., 2018; Chen y Ozanne., 2006).

Del mismo modo, la fosforilación de la H2AX favorece la senescencia al promover el arresto del ciclo celular y el fenotipo secretor asociado a senescencia (Rodier et al., 2011). En su conjunto, la presencia en diferentes tejidos de esta secuencia de degeneración apunta a que su coexistencia es una característica general de la muerte celular embrionaria.

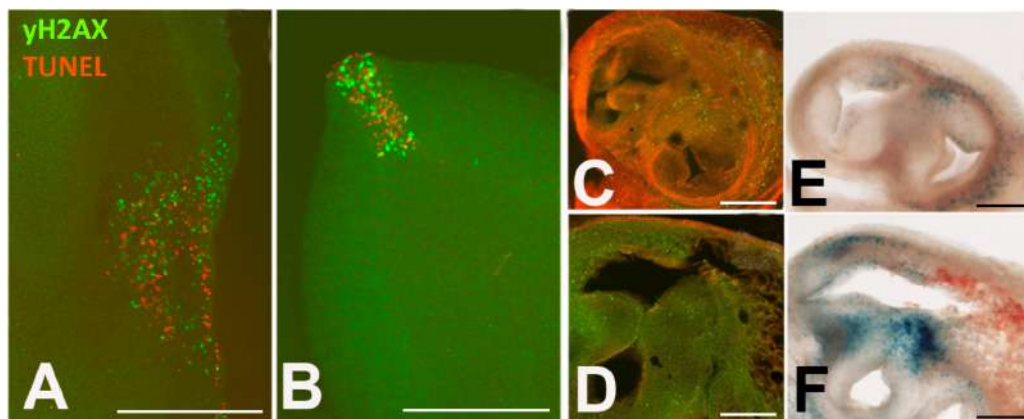


Figura 18. En el área necrótica posterior (A) y la cresta ectodérmica apical (B) se producen eventos de degeneración celular durante el desarrollo de la extremidad caracterizados por la presencia de células con daño en el ADN, marcadas con γ -H2AX positivas, y células apoptóticas, TUNEL positivas. En el corazón, a nivel de las válvulas semilunares (C) y del tracto de salida de las grandes arterias (D), también se encuentran células positivas para γ -H2AX como se observa en estos tejidos embrionarios de pollo de 7 días PI. El color rojo de estas imágenes muestra los filamentos de actina. Las células senescentes, positivas para β -galactosidasa, aparecen en aquellas áreas del corazón donde las células presentan un marcaje para γ -H2AX (E-F). Escala: 200 μ m.

Al igual que ocurre en nuestro modelo de remodelado, en tejidos adultos o tumorales se han asociado las roturas de las hebras de ADN con una detención del ciclo celular y con procesos de senescencia y apoptosis (Malaquin et al.; 2015). Además, en retinas embrionarias y postnatales, la presencia de marcadores de respuesta al daño en el ADN junto con indicadores de apoptosis ha sido descrita e interpretada como un mecanismo protector o inductor de la regresión tisular (Baleriola et al., 2010; Martín-Oliva et al., 2015). En base a estos estudios y atendiendo a la secuencia de degeneración observada en nuestro modelo, la aparición de daño en el ADN podría ser considerada como un evento inicial de la regresión interdigital, previo a la aparición de la senescencia y la apoptosis (Montero et al., 2016). De igual forma, la activación en las células del mesodermo interdigital de una respuesta para reparar las roturas del ADN sugiere que el proceso de regresión interdigital es más una respuesta secundaria a cambios en señales locales reguladoras, que la tradicional idea de un “suicidio celular”.

Quizás, las características propias que, en un determinado momento, presentan los progenitores esqueléticos pueden tener algo que ver con la causa de la muerte.

En esta línea argumental, la configuración de la cromatina de las células presentes en dicho tejido en regresión podría ser clave para que las señales utilizadas para promover la diferenciación de los progenitores esqueléticos actúen como indicaciones letales que dañen el ADN en las células que no han iniciado el proceso de diferenciación. Así, si la configuración de la cromatina no fuese la adecuada para dar respuesta a los estímulos activos que están recibiendo las células, su ADN se fragmentaría iniciándose así el proceso de degeneración y posterior apoptosis. Dicho de otra manera, las células localizadas en el tejido del espacio interdigital serían vulnerables a señales que promueven el crecimiento y la diferenciación de los progenitores que han iniciado su destino esquelético. Un mecanismo similar de inducción de muerte, conocido como control de la remodelación de la cromatina (*Chromatin remodeling checkpoint*), se ha formulado recientemente para seleccionar los destinos apropiados de las células madre y evitar la metaplasia (Zaret., 2017; Ji., 2017). Teniendo presente esta idea y puesto que los mecanismos epigenéticos son fundamentales para establecer la configuración de la cromatina, decidimos analizar y caracterizar con más detalle uno de ellos: la metilación en el ADN, con el fin de intentar descubrir a qué se debe la alta sensibilidad a las roturas en el ADN que presentan las células interdigitales en las etapas que preceden al establecimiento de las áreas de muerte celular fisiológica.

5.2 Caracterización epigenética de las células presentes en el tejido del espacio interdigital

5.2.1 Expresión de los genes implicados en la metilación del ADN

La metilación del ADN es una modificación epigenética que se genera como consecuencia de la acción de 3 enzimas, conocidas como ADN metiltransferasas (DNMTs), encargadas de añadir un grupo metilo al carbono 5 de las citosinas (5-mC) que componen la doble hebra. La DNMT1 es responsable del mantenimiento de la metilación y su función radica en transferir los grupos metilo a las hebras hemi-metiladas durante la replicación del ADN; por el contrario, las DNMT3A y DNMT3B son las responsables de la metilación *de novo* (Pan et al., 2016). En la adición de esta marca epigenética se ha visto que también intervienen los factores denominados UHRFs, unas proteínas de unión al ADN capaces de remodelar la cromatina (Hashimoto et al., 2008). Mientras que el papel de UHRF1 como un regulador epigenético esencial en el mantenimiento de la metilación del ADN ha sido ampliamente descrito, la implicación de UHRF2 en dicho proceso es menos conocida (Zhang et al., 2011; Ishiyama et al., 2017). Sin embargo, recientemente algunos estudios apuntan a que UHRF2 podría reconocer y mantener los niveles de 5-hidroximetilcitosina (5-hmC); resultado de la oxidación y/o desaminación de la 5-mC (Chen et al., 2017).

El primer paso de este estudio consistió en la caracterización de los niveles de expresión de los factores epigenéticos mencionados anteriormente, que se realizó mediante un análisis por qPCR a partir de muestras de tejido del espacio interdigital del autopodio de embriones de pollo de 5.5 días PI. Como se puede apreciar en la figura 19, los niveles de expresión de los genes estudiados eran notablemente superiores a los niveles de *Hmgn1*, un gen considerado marcador del mesoderma interdigital indiferenciado (Furusawa et al., 2006).

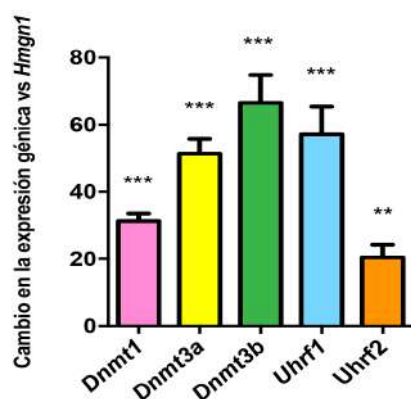


Figura 19. Comparación de los niveles de expresión entre diferentes reguladores epigenéticos y *Hmgn1* en muestras tisulares del espacio interdigital de embriones de pollo de 5.5 días PI. *** $p < 0.001$; ** $p < 0.01$; * $p < 0.05$ versus *Hmgn1*.

Mediante hibridación *in situ* se visualizaron, en autopodios de embriones de pollo de diferentes estadios de edad, los dominios de expresión de las DNMTs y los UHRFs. Como se puede apreciar en la figura 20, los autopodios mostraban intensos dominios de marcaje positivos para las 3 DNMTs en la zona del espacio interdigital y en las articulaciones en desarrollo; zonas en las que, como se ha comentado con anterioridad, ocurren fenómenos de muerte celular durante el remodelado de la extremidad en formación.



Figura 20. Expresión de *Dnmt1* (A), *Dnmt3a* (B) y *Dnmt3b* (C) en autopodios de embriones de pollo de 7.5 días PI. Las flechas señalan los dominios de expresión de cada DNMT en las articulaciones interfalángicas de los autopodios. Escala: 500µm.

También se analizaron los dominios de expresión de *Uhrf1* y *Uhrf2* a lo largo del desarrollo del autopodio y se pudo apreciar como, en ambos casos, la expresión de estos genes quedaba relegada principalmente al tejido presente en el espacio interdigital. Un detalle curioso es que, en las etapas iniciales (día 4.5 PI), el mesodermo subyacente a la cresta ectodérmica apical era negativo para *Uhrf2* como señalan las puntas de flecha en la figura 21G y H; al contrario de lo que ocurría en los autopodios del mismo estadio marcados para *Uhrf1* (Fig. 21A y B). Asimismo, la hibridación *in situ* en secciones longitudinales de autopodios de 7.5 días PI nos permitió identificar dominios adicionales de expresión de *Uhrf1* y *Uhrf2* en las articulaciones interfalángicas, como en el caso de las DNMTs (Fig. 21E y J).

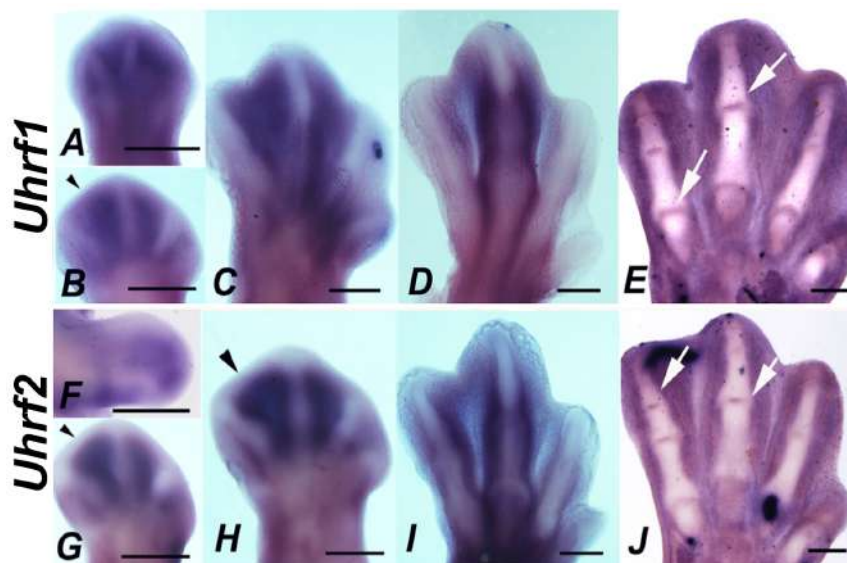


Figura 21. Expresión génica de *Uhrf1* (A-E) y *Uhrf2* (F-J) en autopodios de pollo de 4.5 (F), 5 (A), 5.5 (B, G), 6.5 (C, H) y 7.5 (D, E, I y J) días PI mediante hibridación in situ. Las puntas de flecha señalan la ausencia de expresión de *Uhrf2* en el mesodermo subyacente a la cresta ectodérmica apical (G, H). Las flechas blancas muestran, en secciones de autopodios de 7.5 días PI, los dominios de expresión de *Uhrf1* y *Uhrf2* en las articulaciones interfalángicas en formación (E, J). Escala: 200µm.

El estudio de la expresión de dichos genes en el ratón reveló el mismo patrón de marcaje; restringido a la zona del espacio interdigital y a las articulaciones interfalángicas del autopodio (Fig. 22A-H). Al igual que ocurría en el pollo, el mesodermo ubicado bajo la cresta ectodérmica apical era negativo para *Uhrf2* (flechas de la Fig. 22E y F) pero no para *Uhrf1*.

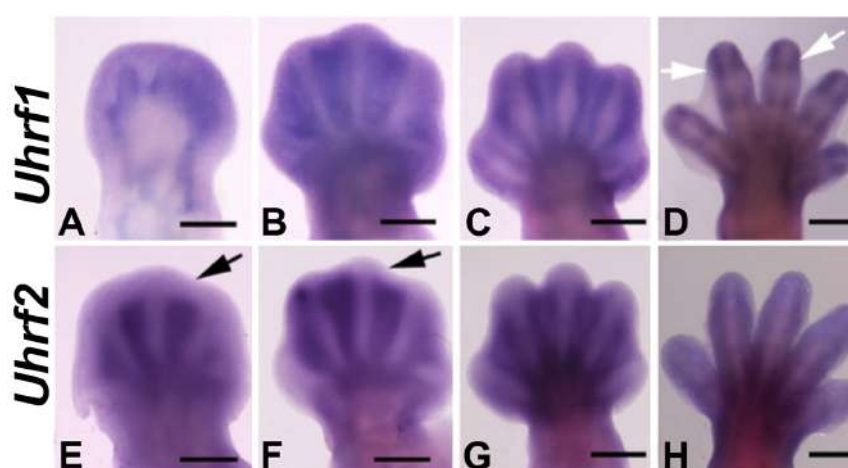


Figura 22. Representación de los dominios de expresión de *Uhrf1* (A-D) y *Uhrf2* (E-H) en autopodios embrionarios de ratón de 12 (A), 12.5 (E), 13 (B, F), 13.5 (C, G) y 14 (D, H) días pc. Las flechas de color blanco señalan los dominios de expresión de *Uhrf1* en las articulaciones interfalángicas de un autopodio de 14 días pc (D). Las flechas de color negro indican la ausencia de expresión de *Uhrf2* en el mesodermo subyacente a la cresta ectodérmica apical (E, F). Escala: 500µm.

A nivel cuantitativo, analizamos los cambios en la expresión de las DNMTs y los UHRFs a lo largo del proceso de regresión del tejido presente en el espacio interdigital del autopodio, comprendido entre los días 5.5 y 7.5 PI del desarrollo del embrión de pollo. Si bien los niveles de expresión de *Dnmt1* disminuían levemente a medida que la degeneración celular se producía, no era hasta el día 7 PI, coincidiendo con el momento en el que la muerte celular está en pleno auge, cuando se observaban cambios significativos con respecto a los niveles control (referentes al tejido del espacio interdigital de embriones de 5.5 días PI, compuesto por mesodermo indiferenciado) (Fig. 23A). A pesar de que los niveles de *Dnmt3a* y *Uhrf2* se mantenían prácticamente constante durante el periodo comprendido en nuestro estudio, los de *Dnmt3b* se reducían progresivamente a partir del día 6.5 PI mientras que los de *Uhrf1* lo hacían de manera significativa en el día 6 PI (Fig. 23B-E). El estudio bioquímico de las proteínas codificadas por estos genes se realizó por Western Blot utilizando tejido del espacio interdigital de los autopodios de pollo de 5.5d y 7.5d PI. Como se muestra en la figura 23F, en todos los casos, los niveles proteicos en los estadios iniciales del proceso de regresión eran superiores a los observados en las etapas tardías, pero el hecho de detectar los niveles proteicos de estos remodeladores epigenéticos, en estadios tan avanzados en los que las células están altamente degradadas, sugiere que podrían jugar un papel significativo en el proceso de remodelación del tejido localizado en el espacio interdigital.

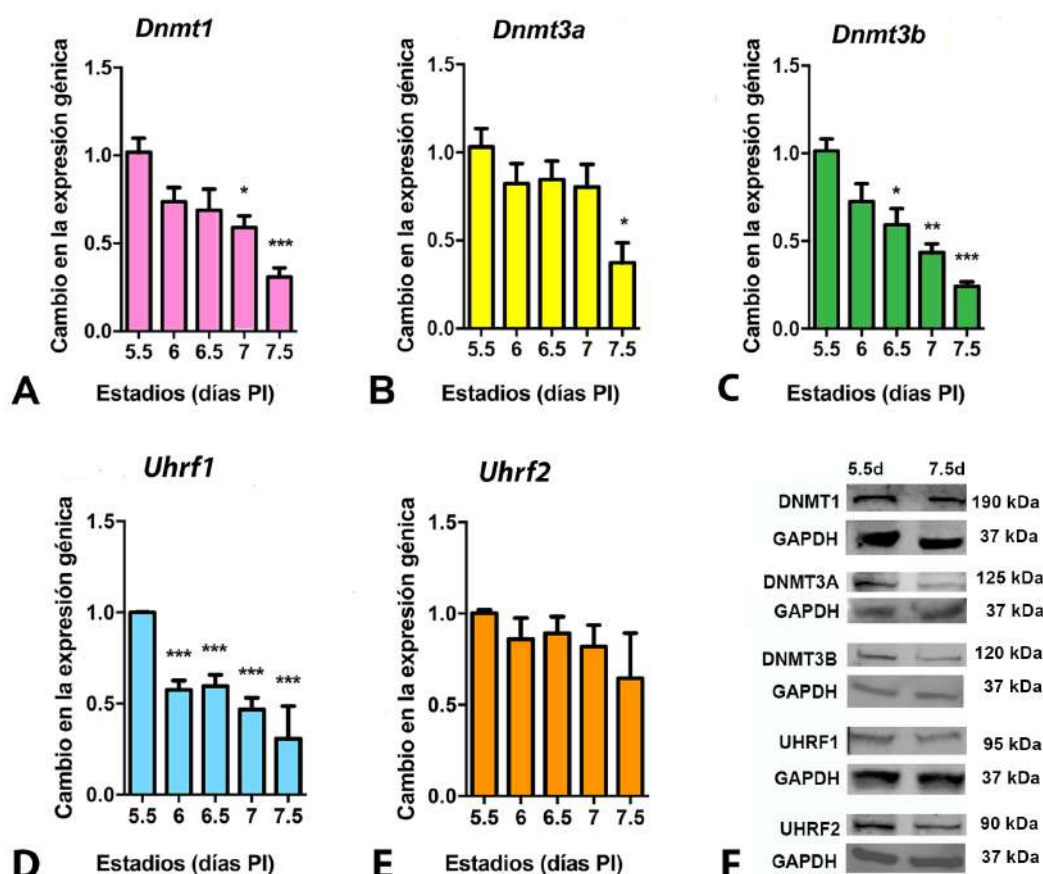


Figura 23. Análisis de los cambios en la expresión génica de *Dnmt1* (A), *Dnmt3a* (B), *Dnmt3b* (C), *Uhrf1* (D) y *Uhrf2* (E) durante la regresión del tejido del espacio interdigital. Los cambios en los niveles proteicos de las DNMTs y los UHRFs al comienzo (día 5.5 PI) y al término (día 7.5 PI) del proceso de remodelación se muestran en los Western Blot; como control de carga se utilizó GAPDH (F). *** $p < 0.001$; ** $p < 0.01$; * $p < 0.05$ versus día 5.5 PI.

5.2.2 Distribución nuclear de los factores epigenéticos

5.2.2.1 Organización de la metilación del ADN y su relación con los mediadores de la DDR

El patrón de metilación del ADN de los progenitores esqueléticos presentes en el espacio interdigital se estudió por inmunofluorescencia gracias a la detección de la 5-mC en disociados celulares. A lo largo del proceso de remodelado, las células del tejido del espacio interdigital presentaban un patrón nuclear punteado con focos de 5-mC de tamaño variable, entre 0.1-0.5 μm (Fig. 24A-D).

En las etapas finales de la regresión, el marcaje de 5-mC se localizaba en la periferia del núcleo de las células en degeneración, formando una especie de corona, y se iba reduciendo hasta su total eliminación a medida que las células se volvían TUNEL positivas (Fig. 24E). Este evento podría ser fruto de la desorganización de la cromatina causada por la fosforilación de los HMGA previa a la activación de las DNAsas (Diana et al., 2001; Montero et al., 2010).

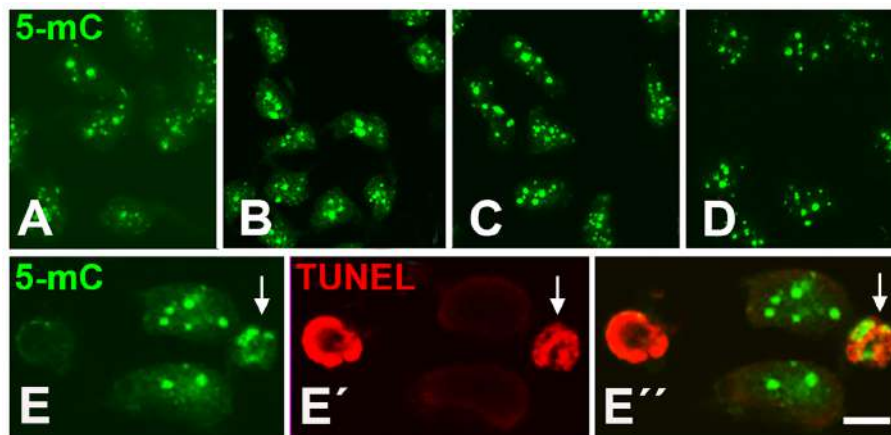


Figura 24. Inmunodetección de 5-mC en disociados celulares procedentes del tejido del espacio interdigital de embriones de pollo de 5.5 (A), 6 (B), 6.5 (C), 7 (D) y 7.5 (E) días PI. Nótese que el patrón de marcaje se distribuye por el núcleo a modo de focos de metilación. En las etapas finales del proceso, día 7.5 PI (E), la metilación del ADN se distribuye, como si de una corona se tratase, por la periferia nuclear en las células con incipiente marcaje para TUNEL (flecha). En aquellas que presentan un avanzado estado de degeneración, el marcaje para 5-mC es prácticamente inexistente. Escala: 5µm.

Los cambios en los niveles de 5-mC se analizaron, mediante ELISA, en los progenitores esqueléticos presentes en el tejido del espacio interdigital de los autopodios de embriones de pollo de entre 5.5 y 7 días PI. Pese a que en las etapas que preceden al establecimiento del área de muerte interdigital no se observaron cambios en la metilación global, si que fue posible apreciar una disminución significativa a partir del día 6.5 PI, estadio que marca el inicio de la muerte detectable por TUNEL. Esta reducción en la metilación global se prolongaba durante el periodo de eliminación tisular (Fig. 25).

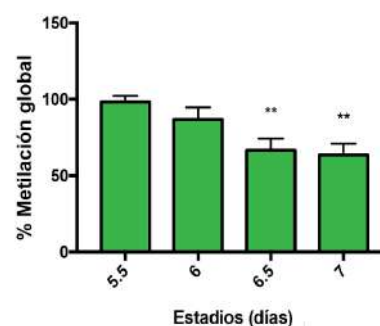


Figura 25. Cambios en los niveles globales de metilación del ADN de los progenitores esqueléticos presentes en el tejido del tercer espacio interdigital de autopodios de embriones de pollo a lo largo del proceso de degeneración. *** $p < 0.001$; ** $p < 0.01$; * $p < 0.05$ versus muestras del día 5.5 PI.

Como se ha descrito previamente, el mesodermo del espacio interdigital experimenta un daño en su ADN que, aparentemente, trata de ser reparado por medio de la activación de una cadena de señalización en respuesta a esa rotura (*DNA Damage Response, DDR*). Por ello, nos pareció interesante estudiar la asociación entre las proteínas implicadas en el proceso de reparación y la metilación del ADN, con el fin de dilucidar si había una asociación entre ellas y qué zonas de la cromatina eran más susceptibles a romperse. El análisis de esta combinación se llevó a cabo, por inmunohistoquímica, en disociados de células del tejido interdigital del autopodio de embriones de pollo de entre 6 y 7 días PI, etapas clave en el proceso de degeneración. En otros modelos de daño, los focos de ADN dañado, positivos para γ -H2AX, se localizan en los dominios de eucromatina, pues su conformación descondensada la hace más vulnerable (Mladenov e Iliakis., 2011). En consonancia con este hecho, pudimos apreciar cómo en nuestro modelo las marcas de γ -H2AX aparecían en el contorno de los focos de ADN metilado, positivos para 5-mC (Fig. 26B-G). En aquellas células donde el marcaje de γ -H2AX era muy intenso, indicativo de una mayor rotura del ADN, los focos de 5-mC parecían fusionarse en un único agregado dispuesto en la zona central del núcleo; en torno al cual se disponía la γ -H2AX (Fig. 26D y E). Otras proteínas participantes en la respuesta de reparación al daño en el ADN, como MDC1, también mostraban un patrón de distribución periférico a los focos de 5-mC (Fig. 26A-A''). Este hecho sugiere que las zonas que limitan esas áreas de metilación son más susceptibles de sufrir roturas que aquellas que están metiladas, ya que como se ha descrito en numerosos trabajos, esta marca epigenética se asocia con una cromatina más condensada y de difícil acceso (Jimenez-Useche et al., 2014; Choy et al., 2010).

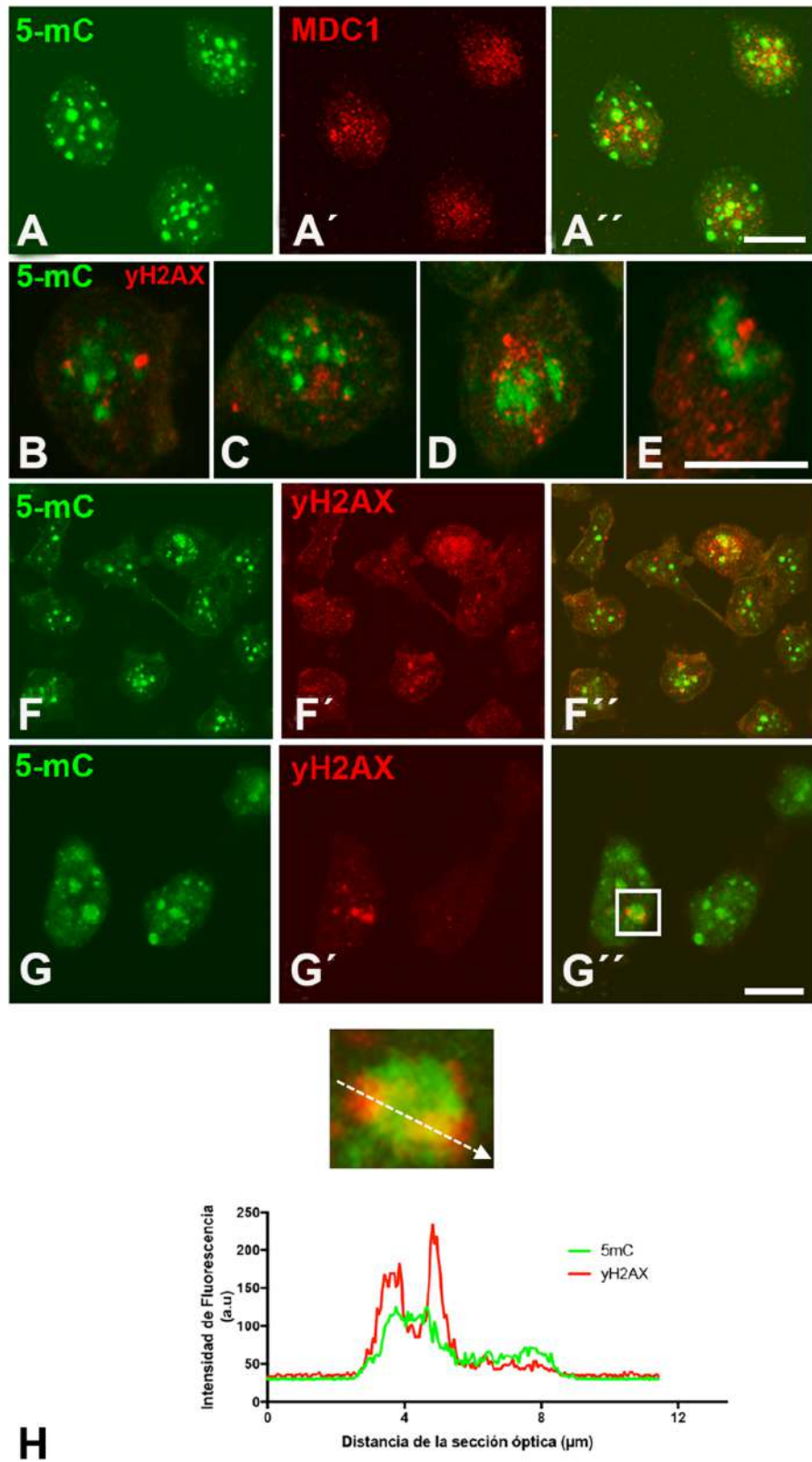


Figura 26. Muestra de la asociación entre la 5-mC y diversos marcadores de daño en el ADN, MDC1 (A) y γ -H2AX (B-G), en disociados celulares del tejido del espacio interdigital de embriones de pollo de 6 y 7 días PI. Perfil lineal de la fluorescencia de γ -H2AX y 5-mC, en el que se aprecia cómo las roturas se disponen alrededor de los focos de ADN metilado (H). Escala: 5 μ m.

Los experimentos de doble inmunofluorescencia para la metilación del ADN y los enzimas encargados de ocasionar dicha modificación revelaron una relación inversa entre ambos tipos de marcaje. Mientras que las DNMTs presentaban una distribución difusa por el nucleoplasma celular, la 5-mC se localizaba en focos de escasas micras de diámetro en zonas pobres o carentes de marcaje para las DNMTs (Fig. 27). La ausencia de asociación entre los marcajes apoya la idea de que las DNMTs actúan de manera habitual en zonas del genoma no metiladas, negativas para 5-mC; sin embargo, cabe precisar que, en algunas ocasiones, el marcaje de la DNMT3B colocalizaba con el de 5-mC (Fig. 27C).

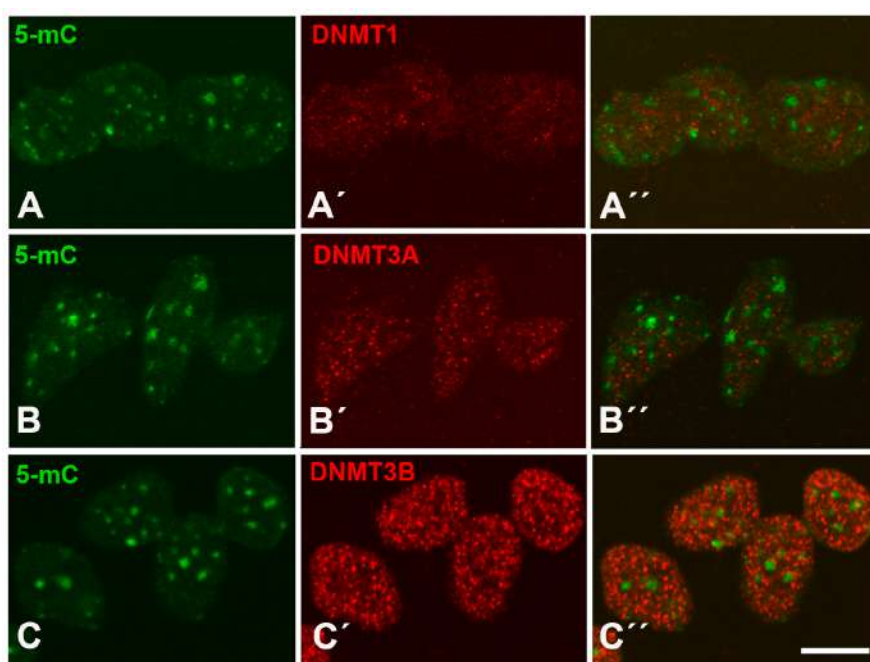


Figura 27. Inmunodetección de la relación existente entre la 5-mC y las DNMTs: DNMT1 (A), DNMT3A (B) y DNMT3B (C) en progenitores esqueléticos del mesoderma interdigital de embriones de pollo de 5.5 días PI. Escala: 5µm.

5.2.2.2 Distribución celular de los UHRFs y su asociación con la metilación del ADN

Para estudiar el patrón que presentaban los UHRFs a nivel celular, se utilizaron disociados procedentes del tejido del espacio interdigital de autopodios de embriones de pollo 6 y 7 días PI. El marcaje de ambos remodeladores, observado por inmunohistoquímica en estas células, era similar al de las DNMTs, apreciándose una distribución nuclear difusa que en algunas zonas se condensaba formando acúmulos de mayor intensidad (Fig. 28A-D'' y 29A-D'').

Debido al importante papel que estos reguladores epigenéticos juegan en la metilación del ADN, nos pareció interesante hacer un doble inmunomarcaje para ver su asociación con la 5-mC (Kong et al., 2019). De este modo pudimos observar cómo algunos focos de metilación colocalizaban con UHRF1 y cómo tanto este remodelador, como UHRF2, se disponía en el interior de anillos de 5-mC (Fig. 28B-B'' y 29B-B''). Otro dato sorprendente es que, como se aprecia en las figuras 28C-C'' y 29C-C'', las células en degeneración que comienzan a perder el marcaje de la 5-mC son más positivas para los UHRFs. No obstante, este incremento en el marcaje parece un hecho transitorio ya que las células TUNEL positivas mostraban una pérdida muy acentuada del marcaje para UHRF1 y UHRF2 (Fig. 28D-D'' y 29D-D'').

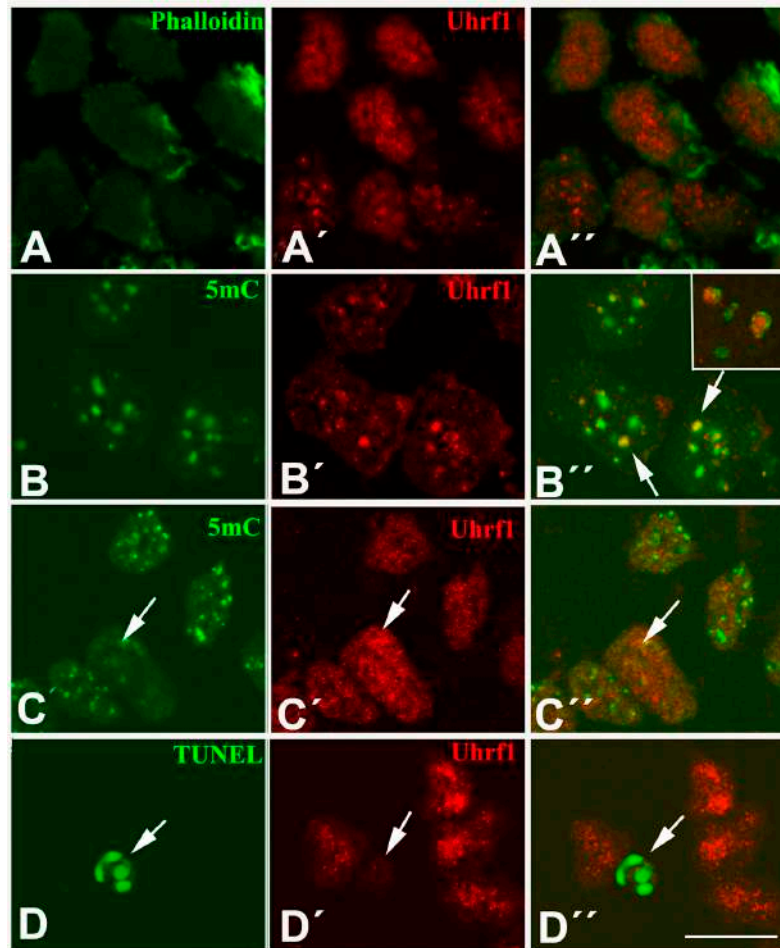


Figura 28. Células interdigitales disociadas procedentes de autopodios de embriones de pollo de 6 y 7 días PI. UHRF1 presenta una distribución nuclear como se aprecia al combinarlo con un marcador de los filamentos de actina, phalloidin, presentes en el citoplasma (A-A''). Como indican las flechas (B''), en algunas células se forman anillos de 5-mC dentro de los cuales se localiza UHRF1. En aquellas células donde el proceso de degeneración es más avanzado, indicada con la flecha, el marcaje de UHRF1 se potencia en comparación con el de la 5-mC (C-C''). Sin embargo, en células apoptóticas positivas para TUNEL hay una pérdida de UHRF1, como muestra la flecha (D-D''). Escala: 10µm.

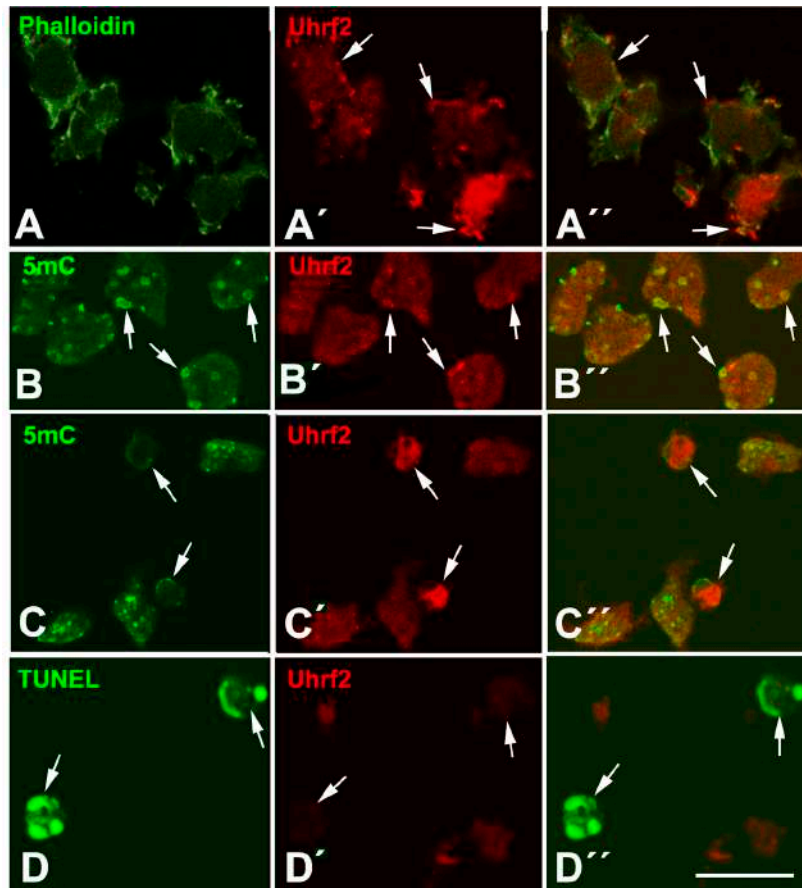


Figura 29. Disociados de progenitores esqueléticos de autopodios de embriones de pollo de 6 y 7 días PI. UHRF2 presenta una distribución principalmente nuclear, aunque también es posible observar cierto marcaje en el citoplasma (flechas) como se aprecia al combinarlo con un marcador de filamentos de actina como la phalloidin (A-A''). El co-inmunomarcaje muestra la existencia de focos de UHRF2 rodeados por anillos de metilación, señalados por las flechas (B-B''). En las células en degeneración, señaladas por las flechas, el marcaje de UHRF2 se vuelve más intenso mientras que el de 5-mC disminuye (C-C''). Esta pérdida de intensidad también se observa en las células apoptóticas, positivas para TUNEL (D-D''). Escala: 10µm.

5.3 Implicación de la metilación del ADN durante la diferenciación condrogénica

La ausencia de transcritos de la *Dnmt3b* y los *Uhrfs* en los radios digitales, unido a los elevados niveles de expresión que dichos remodeladores presentaban en nuestro tejido de interés, nos hizo pensar que estos reguladores epigenéticos podrían actuar como potenciales inhibidores de la diferenciación condrogénica. Para testar esta hipótesis, decidimos monitorizar su expresión en progenitores esqueléticos del autopodio de embriones de pollo de 4.5 días PI cultivados *in vitro* en condiciones de alta densidad.

En este modelo de cultivo, los progenitores esqueléticos crecen durante las primeras horas de forma indiferenciada para, pasadas 48 horas, comenzar a agregarse y formar nódulos condrogénicos (Fig. 30A). Éstos se separan unos de otros por células que presentan características morfológicas y transcripcionales similares a las existentes en el tejido conectivo fibroso. En los días posteriores, los nódulos condrogénicos aumentan en número y tamaño llegando a formar una capa continua de cartílago. Este modelo de micromasas mimetiza el proceso de diferenciación del cartílago que tiene lugar durante la formación de los dedos en el organismo *in vivo*, representando una buena aproximación para realizar los experimentos funcionales.

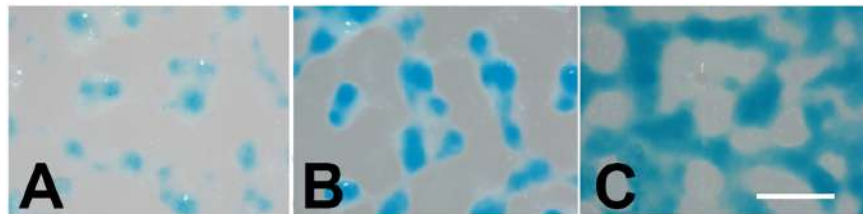


Figura 30. Progenitores esqueléticos del autopodio de embriones de pollo de 4.5 días PI cultivados *in vitro* en alta densidad durante 2 (A), 3 (B) y 4 (C) días teñidos con azul alción para la detección de cartílago. Escala: 200 μ m.

5.3.1 Análisis funcional de la expresión de *Dnmt3b* durante la diferenciación condrogénica en cultivos celulares de progenitores esqueléticos

El primer paso en dicho estudio fue el análisis, por qPCR, de los niveles de expresión de esta DNMT en los cultivos de alta densidad de los progenitores esqueléticos del autopodio de embriones de pollo de 4.5 días PI. Como se muestra en la figura 31, los niveles de *Dnmt3b* en las micromasas se reducían de manera significativa a medida que avanzaban los días en cultivo; hecho que hace pensar en una relación inversa entre este enzima y la diferenciación condrogénica.

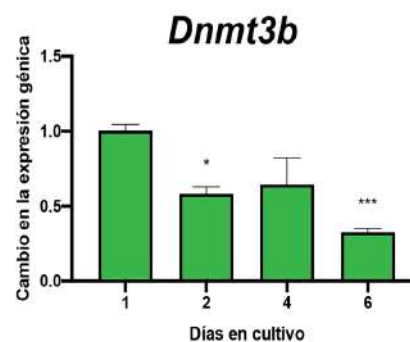


Figura 31. Análisis cuantitativo de la expresión génica de *Dnmt3b* en cultivos de micromasas de 1, 2, 4, y 6 días. *** $p < 0.001$; ** $p < 0.01$; * $p < 0.05$ versus control (micromasas de 1 día en cultivo).

Con el fin de analizar la influencia que tienen los cambios en la metilación del ADN en el destino esquelético de los progenitores de la extremidad en desarrollo, seleccionamos el gen *Dnmt3b* como diana para realizar ensayos funcionales *in vitro*.

En los experimentos de ganancia de función, los progenitores esqueléticos se electroporaron con un vector de expresión para el gen *Dnmt3b* mientras que, los silenciamientos, se indujeron mediante la nucleofección de ARNs pequeños de interferencia (*short hairpin RNA interference, shRNAi*) para dicho gen. En ambos casos, los cultivos control fueron electroporados con vectores vacíos. Después de dos días, la sobreexpresión de *Dnmt3b* (representada en la Fig. 32 como *cDNMT3B*) ocasionaba una notable reducción en la capacidad de diferenciación de los progenitores mesodérmicos en cultivo, observable tras la tinción y posterior cuantificación del colorante azul alcian (Fig. 32B y D). Como puede apreciarse en la figura 32C y E, el silenciamiento de este factor (*shDNMT3B*) aumentaba de manera significativa el potencial condrogénico de las micromasas con respecto al cultivo celular control.

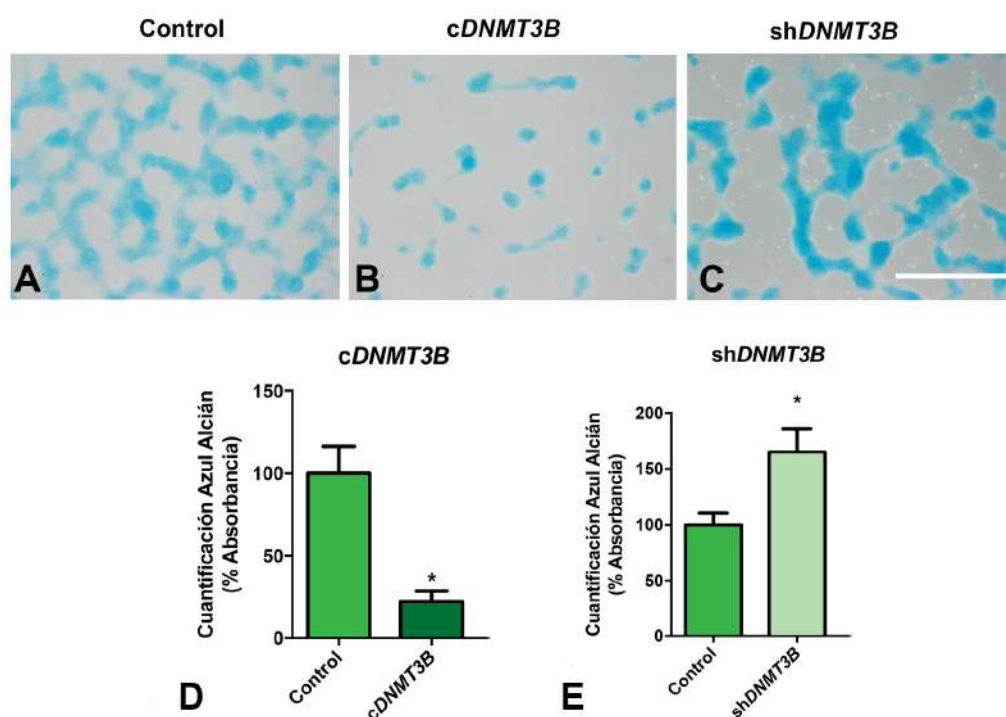


Figura 32. Evaluación de la condrogénesis en los cultivos celulares de progenitores esqueléticos sometidos a experimentos de ganancia (B y D) y pérdida de función (C y E) de *Dnmt3b*. En la parte superior se muestra la vista detallada del aspecto que tienen las micromasas al ser teñidas con azul alcian tras 4 días en cultivo. En las gráficas se representa la cuantificación de este colorante tras su extracción con guanidina-HCl. *** $p < 0.001$; ** $p < 0.01$; * $p < 0.05$ versus control. Escala: 200 μ m.

Para verificar que los fenotipos observados eran fruto de cambios en la metilación de las células transfectadas, se analizaron por ELISA los niveles globales de 5-mC en las distintas muestras. Así, se pudo comprobar cómo la sobreexpresión de *Dnmt3b* producía un aumento en los niveles globales de metilación, que era contrarrestado en los experimentos funcionales de silenciamiento (Fig. 33).

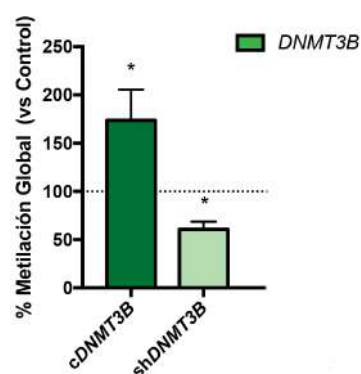


Figura 33. Análisis, mediante ELISA, de los cambios en la metilación global de los cultivos de micromasas en los que se realizaron los experimentos de ganancia (cDNMT3B) y pérdida (shDNMT3B) de *Dnmt3b*. *** $p < 0.001$; ** $p < 0.01$; * $p < 0.05$ versus control (línea punteada).

Para reforzar la posible relación entre la hipometilación del ADN y el potencial condrogénico de las células, decidimos tratar a los progenitores esqueléticos con inhibidores de las DNMTs: la 5-azacitidina (5-Aza) y el RG108. Mientras que los cultivos control presentaban un característico patrón nodular cartilaginoso tras la tinción con el colorante azul alcian (Fig. 34A y D), la adición de estos análogos de la citidina al medio de cultivo potenció el tamaño de los nódulos e incrementó su número a niveles similares a los observados en los experimentos de pérdida de función (Comparar Fig. 32C y E con Fig. 34B-C y F-G). Como era de esperar, el tratamiento con los inhibidores reducía a la mitad los niveles de metilación global de los cultivos tratados (Fig. 34D y H).

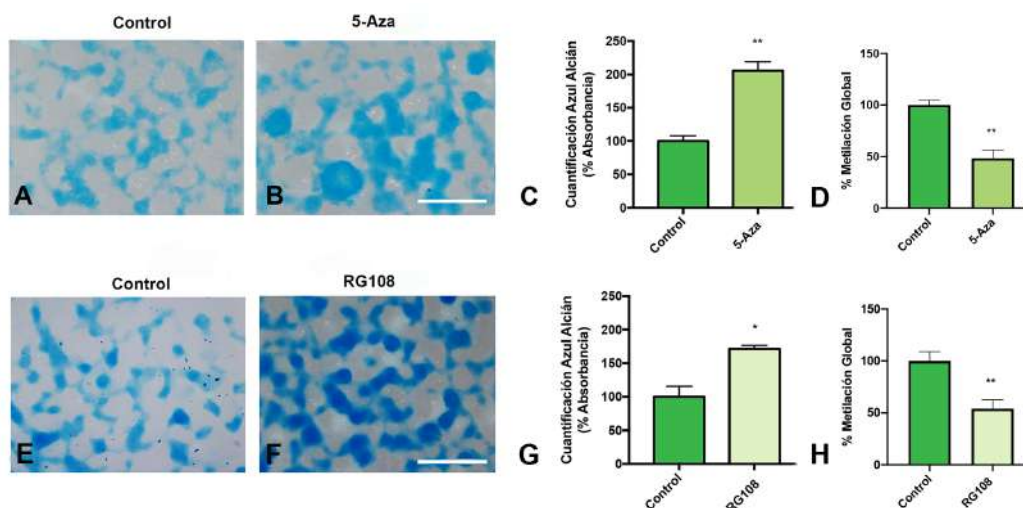


Figura 34. Efecto de los inhibidores de las DNMTs, 5-Aza (B) y RG108 (F) a una concentración de 20 μ M, sobre la condrogénesis de los progenitores esqueléticos cultivados en condiciones de alta densidad durante 4 días. Las gráficas muestran los resultados de la cuantificación de la extracción de azul alcian de las micromasas control y tratadas con 5-Aza (C) y RG108 (G). En (D) y (H) se observa una reducción en los niveles de metilación global de las muestras tratadas con los inhibidores de las DNMTs. *** $p < 0.001$; ** $p < 0.01$; * $p < 0.05$ versus control. Escala: 200 μ m.

5.3.2 Análisis funcional de la expresión de *UHRF1* y *UHRF2* en la diferenciación condrogénica de los progenitores esqueléticos en cultivo

Al igual que en el apartado anterior, se realizaron experimentos funcionales para determinar el grado de implicación que *Uhrf1* y *Uhrf2* tenían en la diferenciación condrogénica de los progenitores esqueléticos de la extremidad en formación. En primer lugar, se analizaron los niveles de expresión de ambos remodeladores de la cromatina en micromasas. Como se puede ver en las gráficas de la figura 35, tras 48 horas en cultivo, los niveles de expresión de *Uhrf1* experimentaron una drástica reducción y continuaron con la misma tendencia en los días posteriores (Fig. 35A). A diferencia de *Uhrf1*, la expresión de *Uhrf2* se mantenía a niveles similares a lo largo de los 5 días de cultivo (Fig. 35B). Estos resultados hacen pensar que al menos uno de estos dos reguladores epigenéticos, UHRF1, podría tener un papel anticondrogénico.

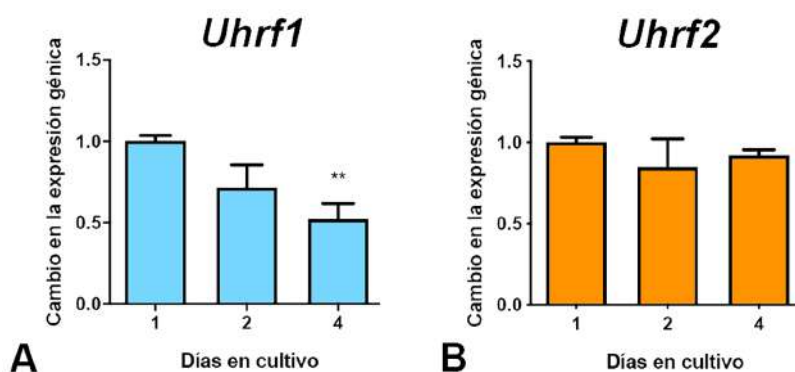


Figura 35. Análisis por qPCR de la expresión génica de *Uhrf1* (A) y *Uhrf2* (B) en cultivos de micromasas de 1, 2 y 4 días. *** $p < 0.001$; ** $p < 0.01$; * $p < 0.05$ versus control (micromasas de 1 día en cultivo).

Para indagar más en esta hipótesis realizamos análisis funcionales, sobreexpresando y silenciando los *Uhrfs*, en cultivos de micromasas procedentes de la región distal del autopodio de embriones de pollo de 4.5 días PI. Tanto la ganancia de función de *Uhrf1* como de *Uhrf2* ocasionaba una reducción en el tamaño y número de los nódulos de cartílago en los progenitores esqueléticos, a día 4 de cultivo, tras la tinción con azul alcian (Fig. 36A-B y F-G). Por el contrario, el silenciamiento de dichos genes producía un notable incremento en la condrogénesis con respecto a los cultivos control, electroporados con el vector vacío (Fig. 36A-C y F-H). Ambas observaciones se validaron tras la extracción, con guanidina-HCl, del colorante azul alcian verificando que, tanto la sobreexpresión de *Uhrf1* (*cUHRF1*) como la de *Uhrf2* (*cUHRF2*), reducían de manera significativa el potencial condrogénico de los progenitores mesodérmicos mientras que, sus silenciamientos (*shUHRF1* y *shUHRF2*), producían el efecto contrario (Fig. 36D-E e I-J).

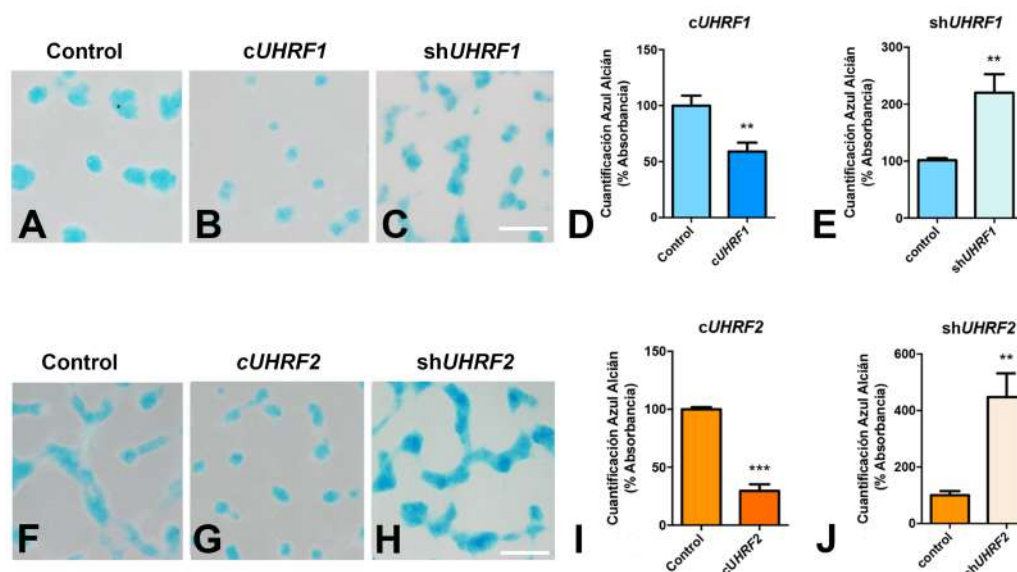


Figura 36. Evaluación de la condrogénesis en los experimentos funcionales de ganancia y pérdida de función de los genes *Uhrf1* y *Uhrf2*. Las imágenes muestran los cultivos de micromasas, teñidos con azul alcian, tras la sobreexpresión o silenciamiento de *Uhrf1* (B y C) y *Uhrf2* (G y H). En las gráficas se representa la cuantificación de azul alcian, tras su extracción con guanidina-HCl, presente en las micromasas sometidas a experimentos de ganancia y pérdida de función de los genes *Uhrf1* (D y E) y *Uhrf2* (I y J). *** $p < 0.001$; ** $p < 0.01$; * $p < 0.05$ versus control. Escala: 200 μ m.

Teniendo en cuenta el papel que ejercen los UHRFs sobre la metilación del ADN creímos conveniente estudiar los cambios globales en esta marca epigenética que presentaban los cultivos de los progenitores mesodérmicos sometidos a experimentos de ganancia o pérdida de función. En la figura 37 puede apreciarse el aumento significativo de la metilación global del ADN de los cultivos celulares nucleofectados con los vectores de expresión para *Uhrf1* y *Uhrf2*.

Sin embargo, el silenciamiento de dichos genes no parecía alterar de manera tan drástica los niveles de 5-mC, aunque podía apreciarse una leve reducción de la metilación global con respecto a las muestras control.

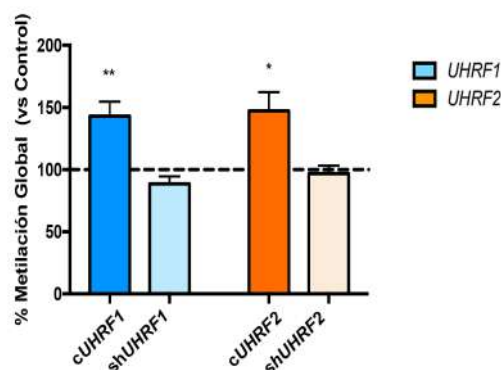


Figura 37. Comparación de los cambios en la metilación global del ADN, cuantificados por ELISA, entre los progenitores control (línea punteada) y aquellos en los que se han llevado a cabo los experimentos de ganancia (cUHRF1 y cUHRF2) y pérdida de función (shUHRF1 y shUHRF2) de *Uhrf1* y *Uhrf2*. *** $p < 0.001$; ** $p < 0.01$; * $p < 0.05$ versus control (línea punteada).

Para interpretar este dato adecuadamente hay que tener en cuenta que, en nuestros silenciamientos, la reducción en la expresión de los genes es aproximadamente del 50% mientras que, en la ganancia de función obteníamos sobreexpresión de más de 10 veces en comparación con las muestras control. Los resultados presentados hasta el momento hacen pensar que, tanto la DNMT3B como los UHRFs, tienen un carácter anticondrogénico que podría estar relacionado con el aumento en los niveles de metilación observados en los progenitores esqueléticos tras los experimentos de ganancia de función de dichos factores epigenéticos.

5.4 Participación de los factores epigenéticos en la modulación de la progresión del ciclo celular y la muerte

5.4.1 Implicación de la metilación del ADN en la progresión del ciclo celular y la muerte de los progenitores esqueléticos

Como se ha descrito a lo largo de la presente Tesis Doctoral, nuestro estudio trata de dilucidar las claves del inicio del remodelado morfogenético que tiene lugar durante la formación de las extremidades: la eliminación del tejido del espacio interdigital. Para averiguar el papel que juega la DNMT3B en este proceso de apoptosis se analizó, por citometría de flujo, el ciclo y la muerte celular de los progenitores esqueléticos transfectados con los vectores de sobreexpresión y silenciamiento para *Dnmt3b*.

En la figura 38 se representa la proporción de células existentes en cada una de las fases del ciclo celular en los experimentos funcionales de ganancia y pérdida de función de *Dnmt3b* tras 2 días de cultivo. Bajo estas condiciones, se observaba un incremento en el número de células en fase S presentes en las micromasas transfectadas con el vector de expresión, así como una leve reducción en la proporción de las que se encontraban en fase G0G1. Como puede apreciarse, la pérdida de función de *Dnmt3b* no parecía afectar a la proliferación celular, pues sus niveles eran prácticamente idénticos a los que presentaban los cultivos control.

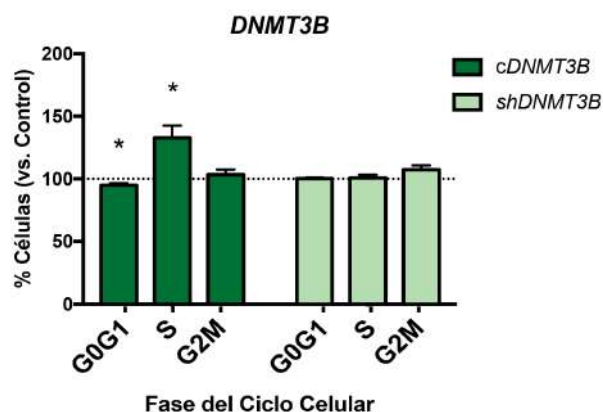


Figura 38. Análisis, por citometría de flujo, de los efectos de los experimentos funcionales de ganancia (*cDNMT3b*) y pérdida de función (*shDNMT3b*) sobre el ciclo celular de las micromasas tras 2 días de cultivo. *** $p < 0.001$; ** $p < 0.01$; * $p < 0.05$ experimentales versus control (representado por la línea punteada).

Atendiendo a los niveles de muerte, la ganancia de función de *Dnmt3b* triplicaba el número de células apoptóticas con respecto al porcentaje presente en los cultivos control, mientras que el silenciamiento de dicho gen reducía la muerte celular de forma significativa (Fig. 39A). Sin embargo, en los cultivos tratados con los inhibidores de las DNMTs, 5-Aza y RG108, la proporción de células apoptóticas no se veía disminuida y era bastante similar a la de los cultivos control (Fig. 39B). Si bien estos dos agentes hipometilantes actúan de manera específica sobre el sitio catalítico de DNMT1, uniéndose a él e inactivándolo, debido a la similitud existente entre los distintos miembros de esta familia de enzimas son capaces de bloquear otras DNMTs (Christman., 2002; Brueckner et al., 2005; Cohen et al., 2012). Este hecho apunta a que la pérdida de metilación del ADN, inducida por el bloqueo de los enzimas encargados de producir dicha marca epigenética, no actúa de manera directa sobre la muerte celular.

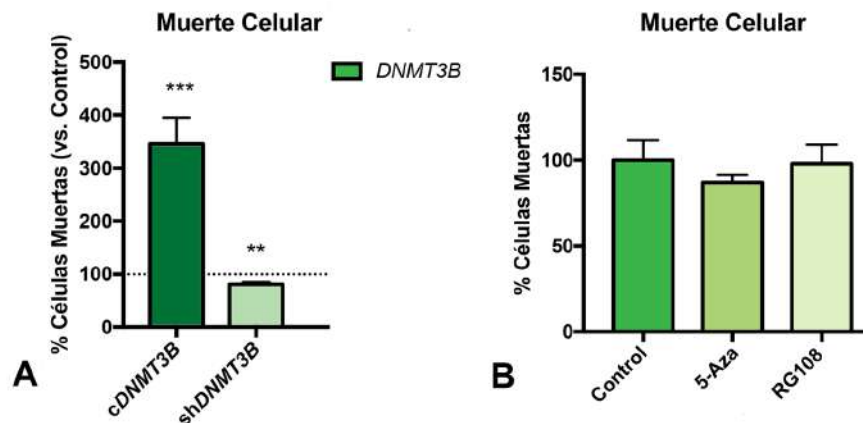


Figura 39. Análisis, por citometría de flujo, de la proporción de células apoptóticas presentes en los cultivos celulares sometidos a experimentos de ganancia (cDNMT3B) y pérdida de función (shDNMT3B) (A) así como en aquellos tratados con los inhibidores de las DNMTs: 5-Aza y RG108 (B). *** $p < 0.001$; ** $p < 0.01$; * $p < 0.05$ versus control (representado en la gráfica A por la línea punteada).

5.4.2 Papel de los UHRFs en la proliferación y la muerte celular del mesodermo indiferenciado de la extremidad en desarrollo

Los resultados obtenidos hasta el momento y presentados en los apartados anteriores hacen pensar que los *Uhrfs* podrían ejercer un papel inhibitorio en la diferenciación de los precursores mesodérmicos. Puesto que durante el desarrollo de la extremidad aquellos progenitores esqueléticos que no se diferencian sufren procesos de senescencia y muerte celular, decidimos estudiar el papel que tenían estos remodeladores epigenéticos en la degeneración de dichas células.

Para ello, se analizaron por citometría de flujo los cambios en la proliferación celular y la muerte de los progenitores esqueléticos de autopodios de embriones de pollo de 4.5 días PI sometidos a experimentos de ganancia y pérdida de función de los genes *Uhrf1* y *Uhrf2*. Tras dos días en cultivo, la sobreexpresión de *Uhrf1* incrementó en un 50% la proporción de células en fase S mientras que su silenciamiento la redujo en un 20% con respecto a los progenitores control, electroporados con el vector vacío (Fig. 40A). La implicación de *Uhrf2* en la progresión del ciclo celular no resultó tan clara, pues su sobreexpresión aumentaba solo ligeramente el número de células en fase S. Por otro lado, al igual que ocurría para *Uhrf1*, el porcentaje de células en fase S presentes en los experimentos de pérdida de función de *Uhrf2* no se reducía más del 20% (Fig. 40B).

El incremento de células en fase S, observado en nuestros experimentos de ganancia de función, se ha descrito como una detención del ciclo celular y es característica de las células que sufren un daño en el ADN (Branzei y Foiani., 2008). Este hecho concuerda con la idea de que los progenitores mesodérmicos indiferenciados presentes en el tejido del espacio interdigital sufren roturas en su ADN que preceden a la muerte celular que tiene lugar durante la remodelación tisular (Montero et al., 2016).

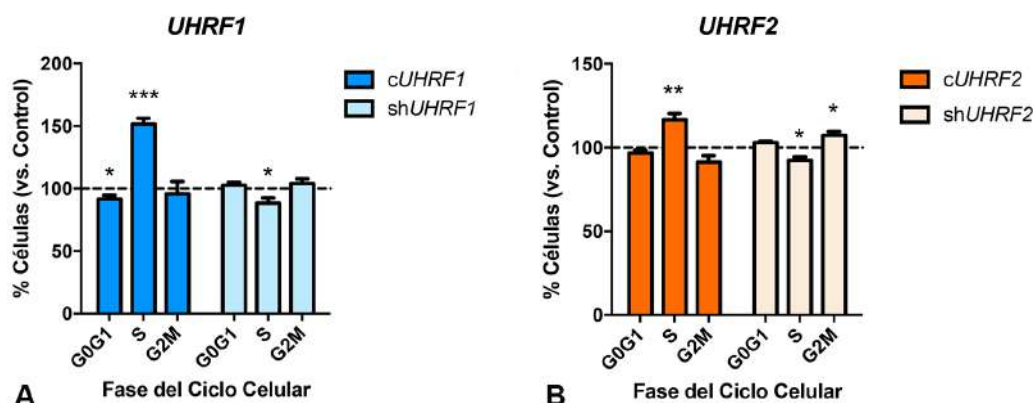


Figura 40. Comparación entre la proporción de células existentes en las distintas fases del ciclo celular en los experimentos de sobreexpresión y silenciamiento de *Uhrf1* (A) y *Uhrf2* (B) y los cultivos control (representados por la línea punteada). *** $p < 0.001$; ** $p < 0.01$; * $p < 0.05$ versus control.

Del mismo modo, se pudo comprobar que al igual que ocurría con la sobreexpresión de *Dnmt3b*, la ganancia de función de *Uhrf1* y la de *Uhrf2* aumentaba hasta tres y dos veces, respectivamente, la proporción de células apoptóticas presentes en el cultivo respecto a la muerte existente en los controles.

De manera complementaria, el silenciamiento de dichos genes inducía una reducción de la muerte celular del 25-35% (Fig. 41).

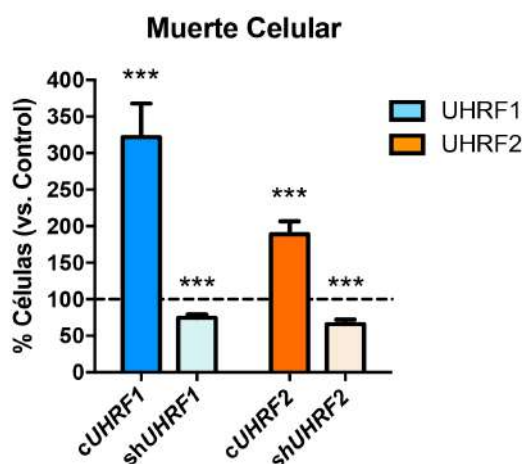


Figura 41. Análisis de la muerte celular, por citometría de flujo, en los cultivos de progenitores mesodérmicos sometidos a experimentos de ganancia y pérdida de función de *Uhrf1* y *Uhrf2*. *** $p < 0.001$; ** $p < 0.01$; * $p < 0.05$ versus control (línea punteada).

5.5 Regulación transcripcional de las cascadas de señalización de la condrogénesis y la muerte celular

5.5.1 Modulación transcripcional en los experimentos funcionales de *Dnmt3b*

Dada la estrecha relación existente entre la metilación y la represión transcripcional, fruto de la condensación de la cromatina promovida por la acción de las DNMTs, consideramos importante estudiar los efectos que la sobreexpresión y el silenciamiento de *Dnmt3b* tenían sobre las principales cascadas moleculares asociadas con la muerte celular, la senescencia y la diferenciación del tejido esquelético. Para ello, se estudiaron los cambios a nivel transcripcional de una batería de genes implicados en dichas rutas, los cuales se muestran en la tabla 9.

En primer lugar, se analizó la expresión de *Sox9* y *Scleraxis (Scx)*, dos genes cuyo balance regula la diferenciación de los progenitores esqueléticos hacia cartílago o tejido fibroso, respectivamente. Tras la sobreexpresión de *Dnmt3b* se observaba una reducción en los niveles de expresión de *Sox9* que iba acompañada de un incremento significativo de la expresión de *Scx*. El desplazamiento en el balance entre los dos destinos de diferenciación que pueden tomar los progenitores esqueléticos en favor del tejido fibrogénico concuerda con el efecto anticondrogénico mencionado anteriormente (ver Fig. 32). Por otra parte, el silenciamiento de esta DNMT parecía no ejercer un efecto claro sobre la expresión de *Sox9*, pero sí sobre *Scx*, que veía reducida su expresión en un 20%. Para el estudio de la senescencia en los cultivos de micromasas transfectados, se seleccionó al gen *p21*, pues se ha descrito como un marcador embrionario de este proceso de degeneración (Storer et al., 2013). Al igual que ocurría con *Scx*, la ganancia de función de *Dnmt3b* aumentaba de forma notable la expresión de *p21* mientras que su silenciamiento disminuía de manera significativa los niveles de expresión transcripcional de este inhibidor del ciclo celular.

Al analizar el efecto de los experimentos funcionales sobre diversos genes implicados en la muerte celular, se pudo observar que la sobreexpresión de *Dnmt3b* regulaba de manera positiva a *Bak1*, implicado en la permeabilización de la mitocondria y los lisosomas, y a *DAB2*, promotor de la autofagia y la apoptosis bajo el control de la señalización por TGF- β (Karch et al., 2017; Jiang et al., 2016).

La implicación de los miembros de la familia de TGF- β en procesos tan diversos como la regulación del ciclo celular, la formación de la matriz extracelular o el desarrollo embrionario esquelético es bien conocida (Sueyoshi et al., 2012; Wu et al., 2016). Recientemente también se ha descrito su capacidad para alterar la actividad de las DNMTs, modificando así los patrones de metilación de algunos genes esenciales para la transición epitelio-mesénquima en cáncer de ovario o durante la diferenciación fibroblástica (Cardenas et al., 2014; Koh et al., 2016). Esta habilidad para modular la metilación del ADN nos hizo preguntarnos si los experimentos funcionales para la *Dnmt3b* afectaban a la expresión de alguno de los componentes de su cascada de señalización. Como muestra la tabla 9, la sobreexpresión de *Dnmt3b* incrementaba la expresión de los genes implicados en dicha ruta, aunque el silenciamiento no llegaba a producir efectos transcripcionales significativos.

Los datos presentados en la tabla 9 concuerdan con los resultados expuestos hasta el momento, en los que se aprecian los efectos anti y procondrogénicos de los experimentos de ganancia y pérdida de función de la *Dnmt3b*, respectivamente.

	<i>cDNMT3B</i>	<i>shDNMT3B</i>
<i>Sox9</i>	0.77 ± 0.08 *	1.09 ± 0.05
<i>Scx</i>	2.17 ± 0.17 ***	0.83 ± 0.04 **
<i>p21</i>	3.65 ± 0.58 ***	0.70 ± 0.08 **
<i>Bak1</i>	2.17 ± 0.28 ***	0.86 ± 0.04 *
<i>DAB2</i>	1.70 ± 0.20 **	0.62 ± 0.04 ***

<i>TGFβr1</i>	1.21 ± 0.10	1.029 ± 0.07
<i>TGFβ2</i>	1.37 ± 0.13 *	0.98 ± 0.05
<i>TGFβr2</i>	1.33 ± 0.07 **	0.91 ± 0.05
<i>LTBP1</i>	1.45 ± 0.11 **	1.08 ± 0.08
<i>LTBP2</i>	1.72 ± 0.13 ***	1.25 ± 0.10
<i>Axin1</i>	1.87 ± 0.14 ***	1.03 ± 0.09
<i>Axin2</i>	1.67 ± 0.18 **	1.03 ± 0.09
<i>TGIF1</i>	1.70 ± 0.18 **	1.19 ± 0.11
<i>SARA</i>	1.66 ± 0.13 ***	1.03 ± 0.08
<i>SnoN</i>	1.9 ± 0.28 **	1.69 ± 0.15 **
<i>Fibrillin2</i>	1.42 ± 0.10 **	0.93 ± 0.060
<i>Dnmt3b</i>	25.20 ± 7.00 **	0.57 ± 0.04 ***

Tabla 10. Influencia de los experimentos de ganancia (cDNMT3B) y pérdida (shDNMT3B) de *Dnmt3b* sobre los niveles de expresión transcripcional de algunos genes implicados en la diferenciación, senescencia y muerte de los progenitores esqueléticos. *** $p < 0.001$; ** $p < 0.01$; * $p < 0.05$ versus control.

Dado que tanto la ganancia como la pérdida de función de *Dnmt3b* tenían un efecto sobre la expresión transcripcional de determinados genes implicados en los procesos clave que tienen lugar durante la regresión del tejido del espacio interdigital, nos pareció interesante analizar si esos cambios se asociaban a variaciones en la metilación de los promotores de dichos genes. La presencia de islas CpG metiladas en estas regiones dificulta la unión de determinados factores de transcripción, llegando a impedir la correcta expresión del gen (Ando et al., 2019).

Por PCR cuantitativa asociada a enzimas de restricción sensibles a metilación (MSRE-qPCR), se estudió el grado de metilación de las islas CpG de los promotores de 4 de los genes más característicos del desarrollo del autopodio implicados en diferenciación (*Sox9* y *Scx*), senescencia (*p21*) y muerte celular (*Bak1*); todos sufrían cambios a nivel transcripcional tras los experimentos funcionales de *Dnmt3b* (ver Tabla 10).

Como se muestra en la figura 42, la sobreexpresión de *Dnmt3b* aumentaba la metilación de las islas CpG del promotor de uno de los genes asociados con la diferenciación de los progenitores esqueléticos, *Sox9* (Fig 42A). Este aumento en la metilación del promotor puede establecer una relación directa con la disminución en la expresión de *Sox9* mostrada en la Tabla 10. A diferencia de *Sox9*, en condiciones de ganancia de función la metilación de las islas CpG presentes en los promotores de *Scx*, *p21* y *Bak1* se reducía de manera significativa, hecho que concuerda con el aumento de su expresión transcripcional (Fig. 42C-E). De manera complementaria a lo observado en los experimentos de ganancia funcional, en las muestras transfectadas con el shRNAi se apreciaba una significativa reducción en la metilación del promotor de *Sox9*, mientras que las regiones promotoras de *Scx*, *p21* y *Bak1* aparecían altamente metiladas (Fig. 42A, C-E). Estos resultados concuerdan con la idea de que la pérdida de función de *Dnmt3b* tiene un efecto procondrogénico, pues, como se ha ido demostrando, el aumento de la condrogénesis va acompañado de una menor metilación en el promotor de *Sox9*, implicado en la diferenciación celular, y un aumento de la misma en el promotor de *Scx*, relacionado con el destino fibrogénico (Fig. 42A y C). Del mismo modo, el aumento de la metilación de las islas CpG de los promotores de *p21* y *Bak1* podría relacionarse con la disminución en la expresión transcripcional de ambos genes fruto del silenciamiento de *Dnmt3b* (Fig. 42D y E).

Un dato que sustenta los resultados expuestos en este apartado es que, si se analiza la metilación del promotor de *Sox9*, en muestras de tejido del espacio interdigital y de la punta del dedo de autopodios de embriones de pollo de 5.5 días PI, puede apreciarse una reducción significativa de los niveles de dicha marca epigenética en esta última localización (Fig. 42B). Así, la población de progenitores esqueléticos indiferenciados de la punta del dedo presenta un promotor de *Sox9* menos metilado y más accesible para que los factores de transcripción sean capaces de unirse y favorecer su expresión promoviendo su diferenciación hacia cartílago.

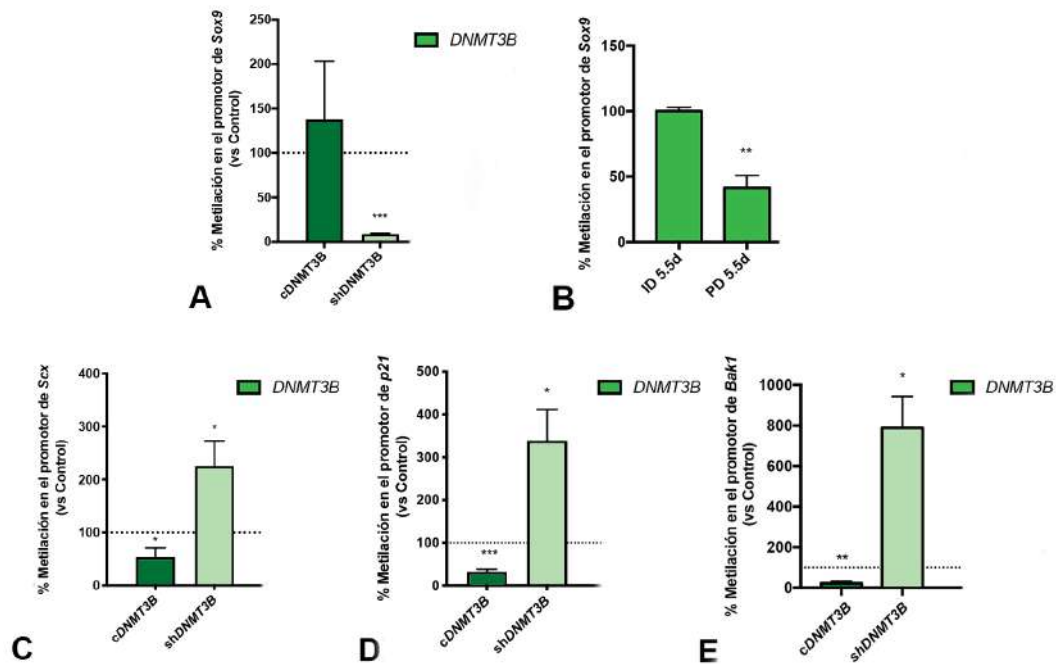


Figura 42. Cambios en la metilación de las islas CpG de los promotores de Sox9 (A), Scx (C), p21 (D) y Bak1 (E) tras los experimentos de ganancia (cDNMT3B) y pérdida de función (shDNMT3B) de Dnmt3b. También se representa la variación en la metilación de las islas CpG del promotor de Sox9 en muestras de tejido del espacio interdigital y de la punta del dedo de embriones de pollo de 5.5 días PI (B). *** $p < 0.001$; ** $p < 0.01$; * $p < 0.05$ versus control (línea punteada). En la gráfica B se toma como control la población de progenitores esqueléticos presente en el interdígito de 5.5 días PI).

5.5.2 Efectos de la sobreexpresión y silenciamiento de los UHRFs a nivel transcripcional

Con el fin de comparar los efectos de los genes UHRFs con las DNMTs, analizamos los cambios en los niveles de expresión de un panel de genes seleccionados para valorar la diferenciación, la senescencia y la apoptosis de los progenitores esqueléticos de la extremidad sometidos a la ganancia o pérdida de función de *Uhrf1* y *Uhrf2*. Como consecuencia de la sobreexpresión de estos remodeladores epigenéticos, se apreciaba una notable reducción de la expresión de *Sox9* siendo los valores de *Scx* similares a los de las muestras control (Tabla 11). De manera opuesta, el silenciamiento no parecía ejercer un efecto claro sobre los niveles de *Sox9*, aunque sí afectaba a *Scx*. A pesar de que los niveles transcripcionales de *Sox9* eran muy similares a los de las muestras control, el desequilibrio en el balance entre ambos genes, fruto de una reducción en los niveles de *Scx*, puede explicar el fenotipo condrogénico observado en las micromasas silenciadas (Figura 36C y H).

Como se muestra en la tabla 11, tanto la ganancia de función de *Uhrf1* como la de *Uhrf2* incrementaba, seis y dos veces respectivamente, los niveles de expresión de *p21*. De manera opuesta, los niveles de expresión se veían reducidos a la mitad en los experimentos de pérdida de función, siendo el silenciamiento de *Uhrf2* el que ocasionaba una disminución más llamativa. El análisis de algunos miembros de la familia génica de *Bcl2*, implicados en muerte celular, puso de manifiesto la significativa regulación que los UHRFs ejercían sobre *Bak1*. La sobreexpresión de *Uhrf1* incrementaba del orden de dos veces la expresión de *Bak1* con respecto al control y el silenciamiento reducía dicha expresión un 40%. Los experimentos funcionales con *Uhrf2* mostraron unos resultados similares, aunque más moderados, en cuanto a la expresión de *Bak1* se refiere. A pesar de que se analizaron otros miembros de la familia de *Bcl2*, como puede apreciarse en la tabla, no se observaron cambios significativos en ellos tras los experimentos de ganancia y pérdida de función.

	cUHRF1	shUHRF1	cUHRF2	shUHRF2
<i>Sox9</i>	0.59 ± 0.07***	0.93 ± 0.09	0.59 ± 0.08***	0.80 ± 0.15
<i>Scx</i>	1.02 ± 0.11	0.59 ± 0.06***	1.17 ± 0.20	0.50 ± 0.09***
<i>p21</i>	6.18 ± 1.98*	0.56 ± 0.07***	2.36 ± 0.35**	0.38 ± 0.08***
<i>Bcl2</i>	1.24 ± 0.10	1.12 ± 0.06	0.89 ± 0.07	1.01 ± 0.14
<i>Bak1</i>	2.44 ± 0.51**	0.59 ± 0.03***	1.80 ± 0.34*	0.80 ± 0.10
<i>Bid</i>	1.45 ± 0.21	0.85 ± 0.06	1.24 ± 0.15	0.92 ± 0.15
<i>Bim</i>	0.99 ± 0.04	1.24 ± 0.12	0.91 ± 0.19	0.98 ± 0.12
<i>Bmf</i>	1.72 ± 0.31*	0.94 ± 0.08	1.02 ± 0.13	0.89 ± 0.14
<i>Uhrf1</i>	10.33 ± 2.88**	0.44 ± 0.03***	1.98 ± 0.35*	0.69 ± 0.07***
<i>Uhrf2</i>	1.26 ± 0.12	0.95 ± 0.05	10.31 ± 2.53**	0.50 ± 0.04***

Tabla 11. Análisis de la influencia transcripcional de los UHRFs, tras los experimentos de ganancia (cUHRF1 y cUHRF2) y pérdida de función (shUHRF1 y shUHRF2), sobre algunos genes implicados en la diferenciación, senescencia y muerte celular de los progenitores mesodérmicos de la extremidad en desarrollo. *** $p < 0.001$; ** $p < 0.01$; * $p < 0.05$ versus control.

Para comprender el significado funcional de la metilación en la regulación de la muerte celular, mediada por los UHRFs, analizamos mediante MSRE-qPCR la metilación de las islas CpG del promotor de *Bak1*. Tanto en los experimentos de ganancia de función de *Uhrf1* como *Uhrf2* se observaba una reducción en la metilación del promotor, más intensa al sobreexpresar *Uhrf1*, que concordaba con el incremento en la actividad transcripcional mostrado en la tabla 9. Al igual que ocurría con la metilación global, el silenciamiento génico de los *Uhrfs* no alcanzaba efectos significativos sobre los niveles de metilación del promotor de *Bak1* (Fig. 43).

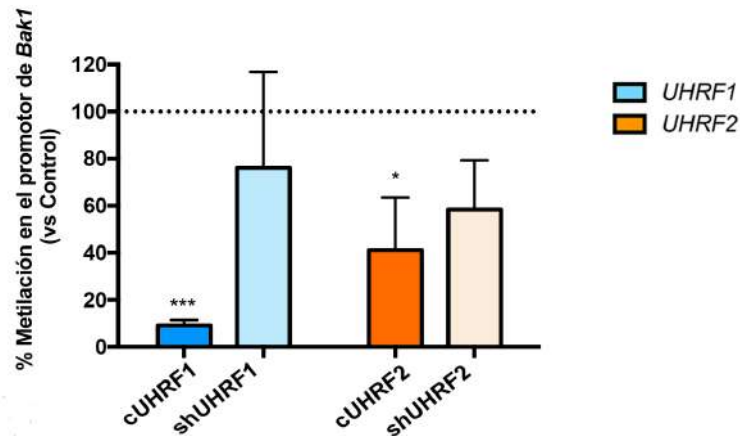


Figura 43. Cambios en la metilación del promotor de *Bak1* tras la sobreexpresión (cUHRF1 y cUHRF2) y el silenciamiento (shUHRF1 y shUHRF2) de los genes *Uhrf1* y *Uhrf2* en comparación con las muestras control (línea punteada). *** $p < 0.001$; ** $p < 0.01$; * $p < 0.05$ versus control.

6. DISCUSIÓN

Las bases celulares y moleculares de los procesos de remodelación que tienen lugar durante el desarrollo embrionario han sido, durante décadas, el foco de numerosas investigaciones; sin embargo, hoy en día, todavía se desconocen algunos de estos mecanismos. Los estudios de embriología clásica llevados a cabo durante la segunda mitad del pasado siglo identificaron la muerte celular como un mecanismo crucial en el desarrollo de los metazoos (Hurle y Ojeda., 1979). Los estudios genéticos iniciales en *C. Elegans*, posteriormente extendidos a insectos y vertebrados, descubrieron una maquinaria molecular conservada para la eliminación de las células muertas en los sistemas en desarrollo (Conradt y Horvitz., 1998). Un popular modelo para el estudio de la muerte celular programada es el proceso de eliminación de los progenitores mesodérmicos localizados en el espacio interdigital, que tiene lugar durante la formación de los dedos a lo largo del desarrollo embrionario de la extremidad de los vertebrados. Este proceso, cuya intensidad se correlaciona con la morfología digital de los amniotas, comprende también la degradación de la matriz extracelular, de los vasos sanguíneos y del epitelio ectodérmico que recubre al tejido del espacio interdigital (Debeer et al., 2002; McCulloch et al., 2009., Hurle y Gañan., 1986; Cordeiro et al., 2019). Para ello, no solo se activan las vías de muerte celular ejecutadas por la familia de enzimas pertenecientes al grupo de las cisteín-aspartico proteasas (caspasas), sino que existen evidencias que revelan la participación de otras rutas de degradación como la permeabilización lisosomal y la autofagia, procesos cooperativos de fagocitosis o disrupción de la membrana celular (Zuzarte-Luis et al., 2007; Montero et al., 2010; Abraham et al., 2007; Svandova et al., 2017). Del mismo modo, durante la eliminación de células y tejidos embrionarios, incluyendo la remodelación de los interdígitos, también se ha detectado la inhibición de la proliferación celular y fenómenos de senescencia (Bečić et al., 2016; Lorda-Diez et al., 2015a).

6.1 El daño en el ADN precede a la apoptosis de los progenitores esqueléticos del espacio interdigital

En esta Tesis Doctoral se ha descrito la activación, en las células del tejido del espacio interdigital, de una respuesta de daño en el ADN previa al comienzo de otros procesos de degeneración como la senescencia o la activación de las caspasas. Esta cascada de señalización en respuesta al daño, implica la fosforilación de la histona H2AX y el reclutamiento de otras proteínas como MDC1, Rad50, 53BP1 o p-ATM a esas zonas de rotura. Sin embargo, la identificación de células TUNEL positivas que no presentan marcaje para estas proteínas de la DDR hace suponer que, en los estadios finales del proceso de regresión tisular, la intensidad del daño y el número de roturas es tal que este mecanismo de reparación no sería suficiente para revertir la lesión y permitir la supervivencia celular. Como consecuencia de ello, se activarían las rutas de degeneración descritas anteriormente que desencadenarían la muerte celular masiva de los progenitores esqueléticos del espacio interdigital. Los numerosos estudios que documentan la relación existente entre la secreción paracrina de las células con daño en el ADN y los procesos de senescencia y apoptosis que sufren sus células vecinas, podrían sustentar esta hipótesis (Malaquin et al., 2015; Fang et al., 2016). Asimismo, la presencia de esta secuencia temporal de degeneración en diferentes áreas del embrión, donde también se producen eventos de eliminación celular, sugiere que es una característica general de la muerte celular embrionaria.

A pesar de que la identificación del factor generador del daño en el ADN no era el objetivo del estudio, dos posibles mecanismos que no se excluyen entre sí podrían ser los responsables. Por un lado, el aumento del estrés oxidativo y la acumulación de especies reactivas del oxígeno (ROS), descrito en el curso de la remodelación del tejido del espacio interdigital, podrían ser los causantes de un daño en el ADN pues como hemos demostrado, tras la aplicación local de peróxido de hidrógeno en el tejido del espacio interdigital, el número de células γ -H2AX aumenta notablemente (Lorda-Diez et al., 2015; Eshkar-Oren et al., 2015; Salas-Vidal et al., 2001). Otra posibilidad, sería que las roturas en el ADN estén asociadas con el estado de compactación de la cromatina que presentan los progenitores esqueléticos del tejido del espacio interdigital.

Los cambios en la conformación de la doble hebra y sus proteínas asociadas están mediados por remodeladores de la cromatina que compiten con la histona H1, entre los que figuran los miembros de la familia de factores de transcripción de alta movilidad (*High Mobility Group, HMG*). Su capacidad para alterar la estructura funcional de la cromatina puede conferir una mayor vulnerabilidad a las roturas del ADN, así como afectar al reclutamiento de las proteínas encargadas de la reparación del daño; afectando a la integridad del genoma y dificultando la supervivencia celular (Beato et al., 2015; Singh et al., 2010). El hecho de que, en el tejido del espacio interdigital, varios miembros de esta familia de remodeladores se expresen a altos niveles, otorga más apoyo a este hipotético mecanismo generador de daño. Concretamente dos de ellos, SOX9 y HMGN1, en combinación con la cascada de señalización por TGF- β , juegan un papel clave en la diferenciación condrogénica de los progenitores esqueléticos presentes en el autopodio (Furusawa et al., 2006; Zhao et al., 2010).

Apostando por esta segunda aproximación y dada la alta sensibilidad a las roturas de ADN que presentaban las células localizadas en el espacio interdigital, decidimos enfocar el estudio hacia el ámbito epigenético, tratando de identificar si la configuración de la cromatina de los progenitores esqueléticos ubicados en dicha zona era una característica importante en su destino final.

6.2 Regulación epigenética de la condrogénesis y la muerte celular programada durante el desarrollo embrionario de la extremidad

El indiscutible papel que la estructura de la cromatina juega en la regulación de procesos tan esenciales para la célula como la transcripción o la replicación, ha permitido el desarrollo de mecanismos epigenéticos capaces de alterar espacial y temporalmente su organización; uno de ellos es la metilación del ADN (Li et al., 2007; Hervouet et al., 2018). Fruto de la adición de un grupo metilo al carbono 5' de la citosina, esta modificación epigenética se asocia con una conformación compacta de la cromatina que dificulta la unión de determinados factores de transcripción induciendo la represión génica (Blattler y Farnham., 2013).

En algunos modelos, la metilación del ADN ha sido descrita como una característica celular clave en la vulnerabilidad a las roturas y a la muerte celular (Luzhna y Kovalchuck., 2010). Un ejemplo de esta asociación se encuentra en los numerosos trabajos en el campo de la Oncología, que otorgan a la hipometilación de las células cancerígenas un papel crucial en la sensibilidad y resistencia a las terapias genotóxicas que se aplican frente a ellas (Wu et al., 2014). De acuerdo con los resultados descritos en la presente Tesis, a diferencia de los radios digitales en crecimiento, las células localizadas en el espacio interdigital, así como en otras áreas donde también ocurren eventos fisiológicos de muerte, eran muy vulnerables a las roturas en el ADN inducidas por la exposición a radiación ionizante. Esta sensibilidad diferencial a la radiación de los progenitores esqueléticos podría estar mediada por la metilación del ADN, pues es en el tejido del espacio interdigital donde se observan dominios de expresión específicos para los enzimas encargados de llevar a cabo dicha modificación, las ADN metiltransferasas (DNMTs), y para los remodeladores de la cromatina implicados en dicho proceso, los UHRFs.

A pesar de que son numerosos los estudios que tratan de dilucidar la relación existente entre la metilación inducida por las DNMT y la muerte celular, hasta la fecha los resultados son bastante controvertidos. Mientras que en tejidos tumorales la inhibición de las DNMTs induce senescencia y apoptosis, en otros contextos impide la muerte celular (Hofstetter et al., 2010; Tang et al., 2017; Venturelli et al., 2014; Li et al., 2019). De la misma manera, la alta letalidad observada en embriones con escasos niveles de metilación respalda la idea de un efecto pro-apoptótico asociado con la pérdida de dicha marca epigenética; sin embargo, se han descrito casos en los que la sobreexpresión de las DNMTs de *novo* induce eventos de muerte celular (Wahlin et al., 2013; Kimura et al., 2002; Li et al., 1992; Tittle et al., 2011; Hoang et al., 2017; Jacob et al., 2015; Barzideh et al., 2013; Chestnut et al., 2011; Farinelli et al., 2014). Tomados en conjunto, estos resultados sugieren que la implicación de las DNMTs en la muerte celular podría ser fruto de diferentes mecanismos dependientes de contexto, así como de la metilación o desmetilación selectiva de las islas CpG localizadas en las zonas reguladoras de los genes, como por ejemplo en su promotor (Serra-Juhé et al., 2015).

En nuestro modelo, no hemos podido establecer cambios en la metilación global del genoma y la iniciación de la muerte; sin embargo, la expresión y los estudios funcionales llevados a cabo apuntan a que la metilación del ADN, mediada por la DNMT3b, actúa como un regulador positivo de la muerte celular, afectando a la condrogénesis de los progenitores esqueléticos del autopodio. De manera opuesta, la hipometilación del ADN inducida tras el silenciamiento de dicha DNMT de *ново* reduce la muerte celular de los progenitores esqueléticos incrementando su potencial condrogénico.

Asimismo, los cambios en la metilación de los progenitores esqueléticos, fruto de la ganancia o pérdida de función de la *Dnmt3b*, se acompañan de una regulación transcripcional de los procesos de diferenciación, senescencia y muerte celular. De acuerdo con nuestros resultados, las regulaciones de *Sox9*, *p21* o *Bak1*, observadas tras los experimentos funcionales, podrían estar asociadas de manera inversa con cambios en la metilación de las islas CpG presentes en el promotor de dichos genes que afectarían a su transcripción. La regulación de los patrones de metilación se ha descrito en células embrionarias como un evento de gran importancia en el control de la diferenciación celular (Ambrosi et al., 2017). Nuestros resultados podrían avalar este hecho y sugieren que la metilación de determinados genes, mediada en nuestro caso por la acción de la DNMT3B, conduce a una cascada de eventos transcripcionales de importancia para determinar el destino de los progenitores esqueléticos.

De forma similar, la participación de los UHRFs (UHRF1 y UHRF2) en la regulación de la proliferación, la supervivencia celular y el daño en el ADN ha sido descrita en numerosos tipos de cáncer (Bronner et al., 2007). Aunque no se conoce suficientemente el papel que estos genes juegan durante el desarrollo embrionario, sólo *Uhrf1* parece relacionarse con los procesos de muerte celular, pues los animales KO para dicho gen mueren en las primeras etapas embrionarias (Muto et al., 2002; Sharif et al., 2016; Papait et al., 2007). También se ha podido demostrar la implicación de *Uhrf1* en la formación y el crecimiento de varios órganos, así como su influencia en la maduración del cartílago (Jacob et al., 2015; Yamashita et al., 2018). El fenotipo esquelético que los modelos animales presentaban aporta evidencias acerca del papel que ejerce UHRF1 en el crecimiento y la diferenciación de las placas de crecimiento durante la elongación de los huesos de las extremidades en el periodo postnatal (Yamashita et al., 2018).

Esta función complementa a lo observado en nuestro estudio, donde la contribución de los genes *Uhrf* en la morfogénesis digital radica en la inhibición de la condrogénesis de los progenitores esqueléticos. La disparidad entre los resultados de los distintos estudios sobre los *Uhrfs* sugiere que la función de estos genes podría depender en gran medida de factores cuya presencia en las células guarda relación con el estadio de diferenciación en el que se encuentren.

De acuerdo con los resultados presentados, podemos decir que en el autopodio embrionario, los dominios de expresión de dichos genes se localizan estrictamente en zonas constituidas por progenitores indiferenciados. Unas células que, en condiciones *in vitro*, experimentan una reducción progresiva de los niveles de expresión de *Uhrf1* a medida que se van diferenciando a cartílago. Estas observaciones sustentan la idea de que los genes *Uhrf*, especialmente *Uhrf1*, intervienen en el mantenimiento del estado indiferenciado de los progenitores esqueléticos. Nuestros análisis funcionales, sobreexpresando y silenciando los UHRFs, nos han permitido identificar a *Sox9* y *Scx* como dos potenciales mediadores de la influencia anticondrogénica que los UHRFs tienen sobre los progenitores esqueléticos. Ambos genes actúan de forma opuesta durante la diferenciación esquelética en favor del destino condrogénico o fibrogénico, respectivamente; y sufren importantes cambios a nivel transcripcional tras nuestros experimentos de ganancia y pérdida de función (Chimal-Monroy et al., 2003; Liu et al., 2018; Furumatsu y Asahara., 2010). Este hallazgo sugiere que los *Uhrfs* poseen una función represora complementaria sobre dos genes fundamentales para establecer el destino de los progenitores esqueléticos. Los resultados que hemos obtenidos en la presente Tesis muestran que los efectos de los UHRFs son similares a los observados tras la sobreexpresión y el silenciamiento de *Dnmt3b*. La participación de los UHRFs en la modulación de los patrones de metilación del ADN y en la alteración de diversas modificaciones postraduccionales de las histonas, da una muestra del grado de relación que tienen con otros factores epigenéticos, hecho que podría avalar los resultados obtenidos en nuestro estudio (Choudhry et al., 2018; Jia et al., 2016; Ashraf et al., 2017; Beck et al., 2018).

En células cancerígenas, la desregulación de los UHRFs ocasiona cambios en la proliferación celular, incrementa el potencial metastásico de las poblaciones tumorales, la sensibilidad a agentes dañinos del ADN e induce eventos de senescencia (Lu y Hallstrom., 2013; Muto et al., 2002; Ashraf et al., 2017; Patnaik et al., 2018; Zhou et al., 2013; Beck et al., 2018). De igual forma, hemos podido comprobar que tanto la sobreexpresión de *Uhrf1* como de *Uhrf2* induce en los progenitores esqueléticos una acumulación en la fase S del ciclo celular, así como cambios, a nivel transcripcional, en *p21*. La detención del ciclo es un rasgo característico de las células senescentes asociado a la rotura del ADN, como se ha descrito durante el proceso de regresión del tejido del espacio interdigital (Lorda-Diez et al., 2015).

Aunque en otros modelos también se ha observado la implicación de los UHRFs en los procesos de senescencia, fruto de su participación en la regulación del ciclo celular y en el mantenimiento de la metilación de las células en división; en algunas líneas celulares tumorales los UHRFs parecen ejercen una acción opuesta, afectando de forma negativa a *p21* (Jung et al., 2017; Beck et al., 2018; Obata et al., 2014; Kim et al., 2009). Asimismo, en modelos tumorales también se ha descrito la participación de los UHRFs en procesos de apoptosis, regulando la actividad transcripcional de genes supresores de tumores, afectando a la capacidad de reparación de las roturas del ADN o alterando la sensibilidad del tumor a la radioterapia (Choudhry et al., 2018; Lu y Hallstrom., 2013; Ge et al., 2016; Jia et al., 2016; Yang et al., 2013). Nuestros resultados concuerdan con esa idea pues, como se ha comentado con anterioridad, la sobreexpresión de estos modificadores de la cromatina intensifica la muerte celular de los progenitores esqueléticos e incrementa los niveles de expresión de *Bak1*, miembro proapoptótico de la familia de *Bcl-2*. La existencia de factores que, junto con los UHRFs, forman complejos heteroméricos de unión a los promotores génicos con el fin de modular su expresión, podría explicar las discrepancias existentes entre los estudios publicados hasta el momento (Beck et al., 2018). Así, dependiendo del tipo y de la fase del ciclo en la que se encuentren las células, los UHRFs podrían interaccionar con unos factores u otros para desempeñar las distintas funciones observadas.

En resumen, nuestro estudio revela la existencia de un nuevo nivel de regulación en los procesos de senescencia y apoptosis que tienen lugar, durante la regresión del tejido interdigital, en etapas previas a la activación de los componentes de la vía intrínseca responsable de ejecutar la muerte celular embrionaria.

Los resultados mencionados en esta Tesis Doctoral, indican que el balance entre la diferenciación y la potencialidad celular podría ser un paso crítico en la iniciación de la muerte celular programada asociada con la morfogénesis embrionaria. El perfil funcional que presentan los UHRFs, junto con los cambios en la metilación del ADN observados en los experimentos funcionales, sugieren que la organización estructural de la cromatina podría ser un factor importante en la regulación de la senescencia y la muerte celular que ocurren durante el desarrollo embrionario. En base a todos los hechos mencionados, nuestro estudio apoya un nuevo paradigma en la regulación de la muerte celular programada en etapas embrionarias basado en los mecanismos epigenéticos asociados con la diferenciación de los progenitores condrogénicos.

De acuerdo con nuestros resultados, las células del tejido del espacio interdigital destinadas a morir son progenitores capaces de diferenciarse de forma específica hacia un linaje condrogénico (Gañan et al., 1996). Sin embargo, la ausencia o el cese de señales requeridas para la diferenciación y sustentación de la supervivencia celular podría configurar la distribución de las áreas de muerte. Este proceso dual podría generar una población celular con características epigenéticas típicas de células indiferenciadas que colapsa cuando recibe las señales apropiadas para etapas avanzadas de la diferenciación condrogénica como se ha observado en células madre embrionarias de ratones deficientes en *Dnmt1* o durante el desarrollo de los peces cebra (Lei et al., 1996; Li et al., 1992; Tittle et al., 2011). De esta manera, podría generarse una respuesta temprana a estrés caracterizada por la aparición de roturas y por la hipermetilación del ADN, fruto del aumento en la actividad de las DNMT, que desencadenaría en la activación de procesos degenerativos como senescencia y apoptosis. Una secuencia similar de acontecimientos se ha descrito en otros modelos y podría sustentar los resultados presentados en esta Tesis Doctoral (Barzideh et al., 2013; Doshi et al., 2011).

A partir de nuestros resultados se pueden tratar de deducir algunos aspectos importantes:

- ¿Existen realmente las señales específicas de muerte? Los factores de muerte conocidos hasta la fecha, como los BMPs, inducen la muerte de los progenitores esqueléticos presentes en el tejido del espacio interdigital pero, en otras poblaciones celulares, pueden comportarse como inductores de la proliferación o diferenciación celular.

Apoyándonos en nuestros resultados se podría considerar que las señales que desencadenan los eventos degenerativos, que tienen lugar durante la regresión del interdígito, no son verdaderas indicaciones de muerte, sino señales requeridas en etapas avanzadas de la cascada de diferenciación molecular que podrían no ser aceptadas por los progenitores más indiferenciados.

- ¿Es la eliminación del tejido del espacio interdigital un evento de suicidio celular? ¿Están los progenitores mesodérmicos destinados a morir o simplemente están en el lugar correcto en el momento equivocado? El proceso degenerativo que se ha observado y descrito a lo largo de esta Tesis Doctoral no parece responder a lo que cabría esperarse de una eliminación por “suicidio celular”, ya que la eliminación del tejido del espacio interdigital está precedida por roturas en el ADN de los progenitores esqueléticos que tratan de ser reparadas. Este hecho sustenta nuestra idea de que la muerte de dichas células lejos de ser un suicidio celular, como se ha postulado durante años, representa un característico “sabotaje”, utilizando la terminología propuesta por Douglas R. Green (Green., 2019).

7. CONCLUSIONES

Durante la formación de los dedos, las células interdigitales del primordio de la extremidad sufren un proceso de muerte celular masiva que esculpe la forma de los primordios digitales. En el presente estudio hemos investigado el perfil epigenético y su significación biológica durante el proceso degenerativo; de él derivan las siguientes conclusiones:

1. La aparición de roturas en el ADN de los progenitores esqueléticos localizados en el tejido del espacio interdigital es previa a otros procesos de degeneración observados durante la morfogénesis de los dedos como son la senescencia y la apoptosis.
2. El daño en el ADN, observado en los progenitores mesodérmicos, se asocia con la inducción de una respuesta de reparación frente a las roturas.
3. Los progenitores esqueléticos situados en las zonas preapoptóticas del autopodio presentan una mayor sensibilidad, al daño en el ADN y a la inducción de apoptosis, que los ubicados en las regiones condrogénicas.
4. La inducción exógena de muerte en el tejido interdigital desencadena la misma secuencia de degeneración observada de manera fisiológica y, el hecho de encontrarla en otros tejidos embrionarios, apunta a que es una característica general de la muerte celular embrionaria.
5. La sensibilidad diferencial de los progenitores esqueléticos del interdígito puede estar mediada por la metilación del ADN, pues es en esta región donde se observan amplios dominios de expresión de las DNMTs y los UHRFs.
6. La evaluación de la metilación global del ADN de los progenitores mesodérmicos, tras los experimentos de sobreexpresión y silenciamiento de *Dnmt3b* y *Uhrfs*, confirma que estos factores son importantes promotores de la metilación del ADN.

7. Los experimentos funcionales de la *Dnmt3b* y los *Uhrfs* muestran que ambos factores promueven la muerte celular, inhiben la condrogénesis e inducen una detención del ciclo en la fase S en los progenitores esqueléticos.
8. A nivel transcripcional, el efecto anticondrogénico se asocia a una regulación negativa de *Sox9* y positiva de *Scx*, que son, respectivamente, marcadores de la diferenciación condrogénica y fibrogénica de los progenitores esqueléticos.
9. El efecto proapoptótico, resultado de la sobreexpresión de la *Dnmt3b* y los *Uhrfs*, se asocia a una regulación positiva de *Bak1*, promotor de la permeabilidad mitocondrial característica de la apoptosis, y de *p21*, implicado en la senescencia celular embrionaria.
10. La regulación transcripcional de *Sox9*, *p21* y *Bak1* por *Dnmt3b* y los *Uhrfs* está asociada con cambios regionales en la metilación de las islas CpG de sus promotores.
11. En conclusión, los datos presentados en esta Tesis Doctoral indican que la condrogénesis y la muerte celular programada que ocurren durante el desarrollo embrionario de la extremidad son dos procesos regulados epigenéticamente.

8. BIBLIOGRAFÍA

- Aapola U, Lyle R, Krohn K, Antonarakis SE, Peterson P.** Isolation and initial characterization of the mouse Dnmt3l gene. *Cytogenet Cell Genet.* 2001; 92: 122-126. doi: 10.1159/000056881
- Abraham MC, Lu Y, Shaham S.** A morphologically conserved nonapoptotic program promotes linker cell death in *Caenorhabditis elegans*. *Dev Cell.* 2007; 12: 73-86. doi: 10.1016/j.devcel.2006.11.012
- Acosta JC, Banito A, Wuestefeld T, Georgilis A, Janich P, Morton JP, Athineos D, Kang TW, Lasitschka F, Andrulis M, Pascual G, Morris KJ, Khan S, Jin H, Dharmalingam G, Snijders AP, Carroll T, Capper D, Pritchard C, Inman GJ, Longerich T, Sansom OJ, Benitah SA, Zender L, Gil J.** A complex secretory program orchestrated by the inflammasome controls paracrine senescence. *Nat Cell Biol.* 2013; 15: 978-990. doi: 10.1038/ncb2784
- Aguilar-Arnal L y Sassone-Corsi P.** Chromatin landscape and circadian dynamics: Spatial and temporal organization of clock transcription. *PNAS.* 2015; 112: 6863-6870. doi: 10.1073/pnas.1411264111
- Al-Sady B, Madhani HD, Narlikar GJ.** Division of labor between the chromodomains of HP1 and SUV39 methylase enables coordination of heterochromatin spread. *Mol Cell.* 2013; 51: 80-91. doi: 10.1016/j.molcel.2013.06.013
- Allas L, Boumédiene K, Baugé C.** Epigenetic dynamic during endochondral ossification and articular cartilage development. *Bone.* 2019; 120: 523-532. doi: 10.1016/j.bone.2018.10.004
- Aly A y Ganesan S.** BRCA1, PARP, and 53BP1: conditional synthetic lethality and synthetic viability. *J Mol Cell Biol.* 2011; 3: 66-74. doi: 10.1093/jmcb/mjq055
- Ambrosi C, Manzo M, Baubec T.** Dynamics and Context-Dependent roles of DNA methylation. *J Mol Biol.* 2017; 429: 1459-1475. doi:10.1016/j.jmb.2017.02.008

- Ando M, Saito Y, Xu G, Bui NQ, Medet-guk-Ernar K, Pu M, Fisch K, Ren S, Sakai A, Fukusumi T, Liu C, Haft S, Pang J, Mark A, Gaykalova DA, Guo T, Favorov AV, Yegnasubramanian S, Fertig EJ, Ha P, Tamayo P, Yamasoba T, Ideker T, Messer K, Califano JA.** Chromatin dysregulation and DNA methylation at transcription start sites associated with transcriptional repression in cancers. *Nature Communications*. 2019; 20: 2415. doi: 10.1038/s41467-019-10557-7
- Arita K, Isogai S, Oda T, Unoki M, Sugita K, Sekiyama N, Kuwata K, Hamamoto R, Tochio H, Sato M, Ariyoshi M, Shirakawa M.** Recognition of modification status on a histone H3 tail by linked histone reader modules of the epigenetic regulator UHRF1. *PNAS*. 2012; 109: 12950-12955. doi: 10.1073/pnas.1203701109
- Ashraf W, Ibrahim A, Alhosin M, Zaayter L, Ouarrhni K, Papin C, Ahmad T, Hamiche A, Mély Y, Bronner C, Mousli M.** The epigenetic integrator UHRF1: on the road to become a universal biomarker for cancer. *Oncotarget*. 2017; 8: 51946-51962. doi: 10.18632/oncotarget.17393
- Baar MP, Brandt RM, Putavet DA, Klein JD, Derks KW, Bourgeois BR, Stryeck S, Rijksen Y, van Willigenburg H, Feijtel DA, van der Pluijm I, Essers J, van Cappellen WA, van IJcken WF, Houtsmuller AB, Pothof J, de Bruin RWF, Madl T, Hoejmakers JHJ, Campisi J, de Keizer PLJ.** Targeted apoptosis of senescent cells re- stores tissue homeostasis in response to chemotoxicity and aging. *Cell*. 2017; 169: 132-147.e16. doi: 10.1016/j.cell.2017.02.031
- Baleriola J, Suarez T y de la Rosa, EJ.** DNA-PK promotes the survival of young neurons in the embryonic mouse retina. *Cell Death Differ*. 2010; 17: 1697-1706. doi: 10.1038/cdd.2010.46
- Bandyopadhyay D, Curry JL, Lin Q, Richards HW, Chen D, Hornsby PJ, Timchenko NA, Medrano EE.** Dynamic assembly of chromatin complexes during cellular senescence: implications for the growth arrest of human melanocytic nevi. *Aging Cell*. 2007; 6: 577-591. doi: 10.1111/j.1474-9726.2007.00308.x
- Bannister AJ y Kouzarides T.** Reversing histone methylation. *Nature*. 2005; 436: 1103-1106. doi: 10.1038/nature04048

- Bano D y Prehn JHM.** Apoptosis-Inducing Factor (AIF) in physiology and disease: the tale of a repented natural born killer. *EBioMedicine*. 2018; 30: 29-37. doi: 10.1016/j.ebiom.2018.03.016
- Barzideh J, Scott RJ, Aitken RJ.** Analysis of the global methylation status of human spermatozoa and its association with the tendency of these cells to enter apoptosis. *Andrologia*. 2013; 45: 424-429. doi: 10.1111/and.12033
- Beato M, Wright RH, Vicent GP.** DNA damage and gene transcription: accident or necessity? *Cell Res*. 2015; 25: 769-770. doi: 10.1038/cr.2015.71
- Bečić T, Bilan K, Mardešić S, Vukojević K, Saraga-Babić M.** Spatiotemporal distribution of proliferation, proapoptotic and antiapoptotic factors in the early human limb development. *Acta Histochem*. 2016; 118: 527-535. doi: 10.1016/j.acthis.2016.05.008
- Beck A, Trippel F, Wagner A, Joppien S, Felle M, Vokuhl C, Schwarzmayer T, Strom TM, von Schweinitz D, Längst G, Kappler R.** Overexpression of *UHRF1* promotes silencing of tumor suppressor genes and predicts outcome in hepatoblastoma. *Clin Epigenetics*. 2018; 10: 27. doi: 10.1186/s13148-018-0462-7
- Bednar J, Garcia-Saez I, Boopathi R, Cutter AR, Papai G, Reymer A, Syed SH, Lone IN, Tonchew O, Crucifix C, Menoni H, Papin C, Skoufias DA, Kurumizaka H, Lavery R, Hamiche A, Hayes JJ, Schultz P, Angelov D, Petosa C, Dimitrov S.** Structure and dynamics of a 197bp nucleosome in complex with linker histone H1. *Mol Cell*. 2017; 66: 729. doi:10.1016/j.molcel.2017.05.018
- Behonick DJ, Xing Z, Lieu S, Buckley JM, Lotz JC, Marcucio RS, Werb Z, Miclau T, Colnot C.** Role of matrix metalloproteinase 13 in both endochondral and intramembranous ossification during skeletal regeneration. *PLoS One*. 2007; 2: e1150. doi: 10.1371/journal.pone.0001150
- Bestor TH.** Cytosine methylation mediates sexual conflict. *Trends in genetics*. 2003; 19: 185-190. doi: 10.1016/S0168-9525(03)00049-0
- Bestor TH, Edwards JR, Boulard M.** Notes on the role of dynamic DNA methylation in mammalian development. *PNAS*. 2015; 112: 6796-6799. doi: 0.1073/pnas.1415301111

- Bhat SA, Ahmad SM, Mumtaz PT, Malik AA, Dar MA, Urwat U, Shah RA, Ganai NA.** Long non-coding RNAs: mechanism of action and functional utility. *Non-coding RNA research*. 2016; 1: 43-50. doi: 10.1016/j.ncrna.2016.11.002
- Bhutani N, Burns DM, Blaur HM.** DNA demethylation dynamics. *Cell*. 2011; 146: 866-872. doi: 10.1016/j.cell.2011.08.042
- Bianchi ME y Agresti A.** HMG proteins: dynamic players in gene regulation and differentiation. *Curr Opin Genet Dev*. 2005; 15: 496-506. doi: 10.1016/j.gde.2005.08.007
- Bird A.** DNA methylation patterns and epigenetic memory. *Genes Dev*. 2002; 16: 6-21. doi: 10.1101/gad.947102
- Blattler A y Farnham PJ.** Cross-talk between site-specific transcription factors and DNA methylation states. *The journal of biological chemistry*. 2013; 288: 34287-34294. doi: 10.1074/jbc.R113.512517
- Bolden JE, Peart MJ, Johnstone RW.** Anticancer activities of histone deacetylase inhibitors. *Nat Rev Drug Discov*. 2006; 5: 769-784. doi: 10.1038/nrd2133
- Bonaldi T, Langst G, Strohner R, Becker PB, Bianchi ME.** The DNA chaperone HMGB1 facilitates ACF/CHRAC-dependent nucleosome sliding. *EMBO J*. 2002; 21: 6865-6873. doi: 10.1039/emboj/cdf692
- Bostick M, Kim JK, Esteve PO, Clark A, Pradhan S, Jacobsen SE.** UHRF1 plays a role in maintaining DNA methylation in mammalian cells. *Science*. 2007; 317: 1760–1764. doi: 10.1126/science.1147939
- Bradley EW, Carpio LR, Olson EN, Westendorf JJ.** Histone deacetylase 7 (HDAC7) suppresses chondrocyte proliferation and β -catenin activity during endochondral ossification. *J Biol Chem*. 2015; 290: 118-126. doi: 10.1074/jbc.M114.596247
- Bradley EW, McGee-Lawrence ME, Westendorf JJ.** HDAC-mediated control of endochondral and intramembranous ossification. *Crit Rev Eukaryot Gene Expr*. 2011; 21: 101-113.
- Branzei D y Foiani M.** Regulation of DNA repair throughout the cell cycle. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2008; 9: 297-308. doi: 10.1038/nm2351

- Brenner C, Deplus R, Didelot C, Lorient A, Viré A, De Smet C, Gutierrez A, Danovi D, Bernard D, Boon T, Pelicci PG, Amati B, Kouzarides T, de Launoit Y, Di Croce L, Fuks F.** Myc represses transcription through recruitment of DNA methyltransferase corepressor. *EMBO J.* 2005; 24: 336-346. doi: 10.1038/sj.emboj.7600509
- Bronner A, Achour M, Arima Y, Chataigneau T, Saya H, Schini-Kerth VB.** The UHRF family: oncogenes that are drugable targets for cancer therapy in the near future? *Pharmacol. Ther.* 2007; 115: 419-434. doi: 10.1016/j.pharmthera.2007.06.003
- Brueckner B, Garcia Boy R, Siedlecki P, Musch T, Kliem HC, Zielenkiewicz P, Suhai S, Wiessler M, Lyko F.** Epigenetic reactivation of tumor suppressor genes by a novel small-molecule inhibitor of human DNA methyltransferases. *Cancer Res.* 2005; 65: 6305-6311. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-04-2957
- Bustin M.** Chromatin unfolding and activation by HMGN (*) chromosomal proteins. *Trends Biochem Sci.* 2001; 26: 431-437
- Callen E, Di Virgilio M, Kruhlak MJ, Nieto-Soler M, Wong N, Chen HT, Faryabi RB, Polato F, Santos M, Starnes LM, Wesemann DR, Lee JE, Tubbs A, Sleckman BP, Daniel JA, Ge K, Alt FW, Fernandez-Capetillo O, Nussenzweig MC, Nussenzweig A.** 53BP1 mediates productive and mutagenic DNA repair through distinct phosphoprotein interactions. *Cell.* 2013; 153: 1266-1280. doi: 10.1016/j.cell.2013.05.023
- Cao L, Ding J, Dong L, Zhao J, Su J, Wang L, Sui Y, Zhao T, Wang F, Jin J Cai YL.** Negative regulation of p21Waf1/Cip1 by human INO80 chromatin remodeling complex is implicated in cell cycle phase G2/M arrest and abnormal chromosome stability. *PLoS One.* 2015; 10: e0137411. doi: 10.1371/journal.pone.0137411
- Cardenas H, Vieth E, Lee J, Segar M, Liu Y, Nephew KP, Matei D.** TGF- β induces global changes in DNA methylation during the epithelial-to-mesenchymal transition in ovarian cancer cells. *Epigenetics.* 2014; 9: 1461-1467. doi: 10.4161/15592294.2014.971608

- Carlson HL, Quinn JJ, Yang YW, Thornburg CK, Chang HY, Stadler HS.** LncRNA-HIT Functions as an Epigenetic Regulator of Chondrogenesis through Its Recruitment of p100/CBP Complexes. *PLoS Genet.* 2015; 11: e1005680. doi: 10.1371/journal.pgen.1005680
- Carmell MA, Girard A, van de Kant HJ, Bourc'his D, Bestor TH, de Rooij DG, Hannon GJ.** MIWI2 is essential for spermatogenesis and repression of transposons in the mouse male germline. *Dev Cell.* 2007; 12: 503–514. doi: 10.1016/j.devcel.2007.03.001
- Carrillo Oesterreich F, Herzel L, Straube K, Hujer K, Howard J, Neugebauer KM.** Splicing of nascent RNA coincides with intron exit from RNA polymerase II. *Cell.* 2016; 165: 372–381. doi: 10.1016/j.cell.2016.02.045
- Castaño-Betancourt MC, Cailotto F, Herkhof HJ, Cornelis FMF, Doherty SA, Hart DJ, Hofman A, Luyten FP, Maciewicz RA, Mangino M, Metrustry S, Muir K, Peters MJ, Rivadeneira F, Wheeler M, Zhang W, Arden N, Spector TD, Uitterlinden AG, Doherty M, Lories RJU, Valdes AM, van Meurs JBJ.** Genome-wide association and functional studies identify the DOTL1 gene to be involved in cartilage thickness and hip osteoarthritis. *PNAS.* 2012; 109: 8218–8223. doi: 10.1073/pnas.1119899109
- Chang S, McKinsey TA, Zhang CL, Richardson JA, Hill JA, Olson EN.** Histone deacetylases 5 and 9 govern responsiveness of the heart to a subset of stress signals and play redundant roles in heart development. *Mol Cell Biol.* 2004; 24: 8467–8476. doi: 10.1128/MCB.24.19.8467-8476.2004
- Chen CC, Wang KY, Shen CK.** DNA 5-methylcytosine demethylation activities of the mammalian DNA methyltransferases. *J Biol Chem.* 2013; 288: 9084–9091. doi: 10.1074/jbc.M112.445585
- Chen H, Ruiz PD, McKimpson WM, Novikov L, Kitsis RN, Gamble MJ.** MacroH2A1 and ATM play opposing roles in paracrine senescence and the senescence-associated secretory phenotype. *Mol Cell.* 2015; 59: 719–731. doi: 10.1016/j.molcel.2015.07.011
- Chen JH y Ozanne SE.** Deep senescent human fibroblasts show diminished DNA damage foci but retain checkpoint capacity to oxidative stress. *FEBS Lett.* 2006; 580: 6669–6673. doi: 10.1016/j.febslet.2006.11.023

- Chen R, Zhang Q, Duan X, York P, Chen GD, Yin P, Zhu H, Xu M, Chen P, Wu Q, Li D, Samarut J, Xu G, Zhang P, Cao X, Li J, Wong J.** The 5-hydroxymethylcytosine (5hmc) reader UHRF2 is required for normal levels of 5hmC in mouse adult brain and spatial learning and memory. *J Biol Chem.* 2017; 292: 4533-4543. doi: 10.1074/jbc.M116.754580
- Chen XR, Sun SC, Teng SW, Li L, Bie YF, Yu H, Li DL, Chen ZY, Wang Y.** Uhrf2 deletion impairs the formation of hippocampus- dependent memory by changing the structure of the dentate gyrus. *Brain Structure and Function.* 2018; 223: 609-618. doi: 10.1007/s00429-017-1512-1
- Chen YA, Lemire M, Choufani S, Butcher DT, Grafodatskaya D, Zanke BW, Gallinger S, Hudson TJ, Weksberg R.** Discovery of cross-reactive probes and polymorphic CpGs in the Illumina Infinium HumanMethylation450 microarray. *Epigenetics.* 2013; 8: 203–209. doi: 10.4161/epi.23470
- Chen Z, Li S, Subramaniam S, Shyy JY, Chien S.** Epigenetic Regulation: A new frontier for biomedical engineers. *Annu.Rev.Biomed.Eng.* 2017; 19: 195-219. doi: 10.1146/annurev-bioeng-071516-044720
- Chestnut BA, Chang Q, Price A, Lesuisse C, Wong M, Martin LJ.** Epigenetic regulation of motor neuron cell death through DNA methylation. *J neurosci.* 2011; 31: 16619-16636. doi: 10.1523/JNEUROSCI.1639-11.2011
- Cheung KSC, Sposito N, Stumpf PS, Wilson DI, Sanchez-Elsner T, Oreffo ROC.** MicroRNA-146a regulates human foetal femur derived skeletal stem cell differentiation by down-regulating SMAD2 and SMAD3. *PLoS One.* 2014; 9: e98063. doi: 10.1371/journal.pone.0098063
- Childs BG, Durik M, Baker DJ, van Deursen JM.** Cellular senescence in aging and age-related disease: from mechanisms to therapy. *Nat Med.* 2015; 21: 1424–1435. doi: 10.1038/nm.4000
- Chimal-Monroy J, Rodriguez-Leon J, Montero Ja, Gañan Y, Macias D, Merino R, Hurle JM.** Analysis of the molecular cascade responsible for mesodermal limb chondrogenesis: Sox genes and BMP signaling. *Dev Biol.* 2003; 257: 292-301. doi: 10.1016/s0012-1606(03)00066-6
- Chiruvella KK, Liang Z, Wilson TE.** Repair of double-strand breaks by the joining. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2013; 5: a012757. doi: 10.1101/cshperspect.a012757

- Choi ES, Cheon Y, Kang K, Lee D.** The Ino80 complex mediates epigenetic centromere propagation via active removal of histone H3. *Nat Commun.* 2017; 8: 529. doi: 10.1038/s41467-017-00704-3
- Choudhry H, Zamzami MA, Omram Z, Wu W, Mousli M, Bronner C, Alhosin M.** Targeting microRNA/UHRF1 pathways as a novel strategy for cancer therapy. *Onco Lett.* 2018; 15: 3-10. doi: 10.3892/ol.2017.7290
- Choy JS, Wei S, Lee JY, Chu S, Tan S, Lee TH.** DNA methylation increases nucleosome compaction and rigidity. *J Am Chem Soc.* 2010; 132: 1782-1783. doi: 10.1021/ja910264z
- Christman JK.** 5-azacytidine and 5-aza-2'-deoxycytidine as inhibitors of DNA methylation: mechanistic studies and their implications for cancer therapy. *Oncogene.* 2002; 21: 5483-5495. doi: 10.1038/sj.onc.1205699
- Cimmino L, Dawlaty MM, Ndiaye-Lobry D, Yap YS, Bakogianni S, Yu Y, Bhattacharyya S, Shakhovich R, Geng H, Lobry C, Mullenders J, King B, Trimarchi T, Aranda-Orgilles B, Liu C, Shen S, Verma AK, Jaenisch R, Aifantis I.** TET1 is a tumor suppressor of hematopoietic malignancy. *Nat Immunol.* 2015; 16: 653-662. doi: 10.1038/ni.3148
- Cimprich KA y Cortez D.** ATR: an essential regulator of genome integrity. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2008; 9: 616-627. doi:10.1038/nrm2450
- Clapier CR y Cairns BR.** The biology of chromatin remodeling complexes. *Annu Rev Biochem.* 2009; 78: 273-304. doi: 10.1146/annurev-biochem.77.062706.153223
- Clarke B.** Normal bone anatomy and physiology. *Clinical Journal of the American Society of Nephrology.* 2008; 3: S131-139. doi: 10.2215/CJN.04151206
- Cohen A, Huang YW, Hawtin RE, Ware JR, Cesano A, Kornblau SM.** Azacitidine (AZA) and Decitabine (DAC) show differential effects on DNA methyltransferase (DNMT) levels in patients with high risk (HR) myelodysplastic syndrome (MDS). *Blood.* 2012; 120: 4906.
- Conradt B y Horvitz HR.** The *C. elegans* protein EGL-1 is required for programmed cell death and interacts with the Bcl-2-like protein CED-9. *Cell.* 1998; 93: 519-529. doi:10.1016/s0092-8674(00)81182-4

- Cook PJ, Ju BG, Telese F, Wang X, Glass CK, Rosenfeld MG.** Tyrosine dephosphorylation of H2AX modulates apoptosis and survival decisions. *Nature*. 2009; 458: 591–596. doi: 10.1038/nature07849
- Cordeiro IR, Kabashima K, Ochi H, Munakata K, Nishimori C, Laslo M, Janken J, Tanaka M.** Environmental oxygen exposure allows for the evolution of interdigital cell death in limb patterning. *Dev Cell*. 2019; 50: 155-166 e4. doi: 10.1016/j.devcel.2019.05.025
- Correa D, Hesse E, Seriwatanachai D, Kiviranta R, Saito H, Yamana K, Neff L, Atfi A, Coillard L, Sitara D, Maeda Y, Warming S, Jenkins NA, Copeland NG, Horne WC, Lanske B, Baron R.** Zfp521 is a target gene and key effector of parathyroid hormone-related peptide signaling in growth plate chondrocytes. *Dev Cell*. 2010; 19: 533-546. doi: 10.1016/j.devcel.2010.09.008
- Cortellino S, Xu J, Sannai M, Moore R, Caretti E, Cigliano A, Le Coz M, Devarajan K, Wessels A, Soprano D, Abramowitz LK, Bartolomei MS, Rambow F, Bassi MR, Bruno T, Fanciulli M, Renner C, Klein-Szanto AJ, Matsumoto Y, Kobi D, Davidson I, Alberti C, Larue L, Bellacosa A.** Thymine DNA glycosylase is essential for active DNA demethylation by linked deamination-base excision repair. *Cell*. 2011; 146: 67-79. doi: 10.1016/j.cell.2011.06.020
- Cotton AM, Price EM, Jones MJ, Balaton BP, Kobor Ms, Brown CJ.** Landscape of DNA methylation on the X-chromosome reflects CpG density, functional chromatin state and X-chromosome inactivation. *Human Molecular Genetics*. 2015; 24: 1528-1539. doi: 10.1093/hmg/ddu564
- Covarrubias L, Hernández-García D, Schnabel D, Salas-Vidal E, Castro-Obregón S.** Function of reactive oxygen species during animal development: passive or active? *Dev Biol*. 2008; 320: 1-11 doi: 10.1016/j.ydbio.2008.04.041
- Cowley M y Oakey RJ.** Resetting for the next generation. *Molecular Cell*. 2012; 48: 819-821. doi: 10.1016/j.molcel.2012.12.007
- Cremer T y Cremer M.** Chromosome territories. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 2010; 2: 1003889. doi:10.1101/cshperspect.a003889. Review

- Cunningham TJ, Chatzi C, Sandell LL, Trainor PA, Duester G.** Rdh10 mutants deficient in limb field retinoic acid signaling exhibit normal limb patterning but display interdigital webbing. *Dev Dyn.* 2011; 240: 1142-1150. doi: 10.1002/dvdy.22583
- Czabotar PE, Lessene G, Strasser A, Adams JM.** Control of apoptosis by the BCL-2 protein family: implications for physiology and therapy. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2013; 15: 49–63. doi: 10.1038/nrm3722
- D' eletto M, Farrace MG, Rossin F, Strappazon F, Giacomo GD, Cecconi F, Melino G, Sepe S, Moreno S, Fimia GM, Falasca L, Nardacci R, Piacentini M.** Type 2 transglutaminase is involved in the autophagy-dependent clearance of ubiquitinated proteins. *Cell Death Differ.* 2012; 19: 1228-1238. doi: 10.1038/cdd.2012.2
- Das D y Scovell WM.** The binding interaction of HMG-1 with the TATA-binding protein/TATA complex. *J Biol Chem.* 2001; 276: 32597-32605. doi: 10.1074/jbc.M011792200
- Dawlaty MM, Breiling A, Le T, Raddatz G, Barrasa MI, Cheng AW, Gao Q, Powell BE, Li Z, Xu M, Faull KF, Lyko F, Jaenisch R.** Combined deficiency of Tet1 and Tet2 causes epigenetic abnormalities but is compatible with postnatal development. *Dev Cell.* 2013; 24: 310-323. doi: 10.1016/j.devcel.2012.12.015
- de Bont R y van Larebeke N.** Endogenous DNA damage in humans: a review of quantitative data. *Mutagenesis.* 2004; 19: 169-185. doi: 10.1093/mutage/geh025
- De la Serna IL, Ohkawa Y, Imbalzano AN.** Chromatin remodelling in mammalian differentiation: lessons from ATP-dependent remodelers. *Nat Rev Genet.* 2006; 7: 461-473. doi: 10.1038/nrg1882
- Debeer P, Schoenmakers EF, Twal WO, Argraves WS, De Smet L, Fryns JP, Van De Ven WJ.** The fibulin-1 gene (FBLN1) is disrupted in a t(12;22) associated with a complex type of synpolydactyly. *J Med Genet.* 2002; 39: 98-104. doi: 10.1136/jmg.39.2.98
- DeLise AM, Fischer L, Tuan RS.** Cellular interaction and signaling in cartilage development. *Osteoarthritis Cartilage.* 2000; 8: 309-334. doi: 10.1053/joca.1999.0306

- Deng T, Postnikov Y, Zhang S, Garrett L, Becker L, Rácz I, Höltter SM, Wurst W, Fuchs H, Gailus-Durner V, de Angelis MH, Bustin M.** Interplay between H1 and HMGN epigenetically regulates OLIG1&2 expression and oligodendrocyte differentiation. *Nucleic Acids Res.* 2017; 45: 3031–3045. doi:10.1093/nar/gkw1222
- Denis H, Ndlovu MN, Fuks F.** Regulation of mammalian DNA methyltransferases: a route to new mechanisms. *EMBO Rep.* 2011; 12: 647-656. doi: 10.1038/embor.2011.110
- Dhanoa JK, Sethi RS, Verma R, Arora JS, Mukhopadhyay CS.** Long non-coding RNA: its evolutionary relics and biological implications in mammals: a review. *J Anim Sci Technol.* 2018; 60:25. doi:10.1186/s40781-018-0183-7
- Diana F, Sgarra R, Manfioletti G, Rustighi A, Poletto D, Sciortino MT, Mastino A, Giancotti V.** A link between apoptosis and degree of phosphorylation of high mobility group A1a protein in leukemic cells. *J Biol Chem.* 2001; 276: 11354–11361. doi: 10.1074/jbc.M009521200
- Diaz-Mendoza MJ, Lorda-Diez CI, Montero JA, Garcia-Porrero JA, Hurle JM.** Reelin/DAB-1 signaling in the embryonic limb regulates the chondrogenic differentiation of digit mesodermal progenitors. *J Cell Physiol.* 2014; 229: 1397-1404. doi: 10.1002/jcp.24576
- Dixon JR, Gorkin DU, Ren B.** Chromatin Domains: The unit of chromosome organization. *Mol Cell.* 2016; 62: 668-680. doi:10.1016/j.molcel.2016.05.018. Review
- Doshi T, Mehta SS, Dighe V, Balasinor N, Vanage G.** Hypermethylation of estrogen receptor promoter region in adult testis of rats exposed neonatally to bisphenol A. *Toxicology.* 2011; 298: 74-82. doi: 10.1016/j.tox.2011.07.011
- Ea V, Baudement MO, Lesne A, Forné T.** Contribution of topological domains and loop formation to 3D chromatin organization. *Genes (Basel).* 2015; 6: 734-750. doi: 10.3390/genes6030734
- Eckschlager T, Plch J, Stiborova M, Hrabeta J.** Histone deacetylase inhibitors as anticancer drugs. *Int J mol Sci.* 2017; 18. pii:E1414. doi: 10.3390/ijms18071414

- Ehrlich M.** DNA hypomethylation in cancer cells. *Epigenomics*. 2009; 1: 239–259. doi: 10.2217/epi.09.33
- El-Serafi AT, Oreffo ROC, Roach HI.** Epigenetic modifiers influence lineage commitment of human bone marrow stromal cells: differential effects of 5-aza-deoxycytidine and trichostatin A. *Differentiation*. 2011; 81: 35-41. doi: 10.1016/j.diff.2010.09.183
- Eshkar-Oren I, Krief S, Ferrara N, Elliot AM, Zelzer E.** Vascular patterning regulates interdigital cell death by a ROS-mediated mechanism. *Development*. 2015; 142: 672-680. doi: 10.1242/dev.120279
- Eslaminejad MB, Fani N, Shahhoseini M.** Epigenetic regulation of osteogenic and chondrogenic differentiation of mesenchymal stem cells in culture. *Cell J*. 2013; 15: 1-10
- Eymery A, Callanan M, Vourc'h C.** The secret message of heterochromatin: new insights into the mechanisms and function of centromeric and pericentric repeat sequence transcription. *Int J Dev Biol*. 2009; 53: 259-268. doi:10.1387/ijdb.082673ae. Review
- Fang J, Cheng J, Wang J, Zhang Q, Liu M, Gong R, Wang P, Zhang X, Feng Y, Lan W, Gong Z, Tang C, Wong J, Yang H, Cao C, Xu Y.** Hemi-methylated DNA opens a closed conformation of UHRF1 to facilitate its histone recognition. *Nature Communications*. 2016; 7:11197. doi: 10.1038/ncomms11197
- Farinelli P, Perera A, Arango-Gonzalez B, Trifunovic D, Wagner M, Carell T, Biel M, Zrenner E, Michalakis S, Paquet-Durand F, Ekström PA.** DNA methylation and differential gene regulation in photoreceptor cell death. *Cell Death Dis*. 2014; 5:e1558. doi: 10.1038/cddis.2014.512
- Felsenfield G y Groudine M.** Controlling the double helix. *Nature*. 2003; 421: 448-453. doi: 10.1038/nature01411
- Feng J, Chang H, Li E, Fan G.** Dynamic expression of de novo DNA methyltransferases Dnmt3a and Dnmt3b in the central nervous system. *J Neurosci Res*. 2005; 79: 734–746. doi: 10.1002/jnr.20404
- Fernandez-Capetillo O, Lee A, Nussenzweig M, Nussenzweig A.** H2AX: the histone guardian of the genome. *DNA Repair (Amst)*. 2004; 3: 959-967. doi: 10.1016/j.dnarep.2004.03.024

- Fischer MS y Blickhan R.** The tri-segmented limbs of therian mammals: kinematics, dynamics and self-stabilization—a review. *J Exp Zool A Comp Exp Biol.* 2006; 305: 935-952. doi: 10.1002/jez.a.333
- Fradet-Turcotte A, Canny MD, Escribano-Diaz C, Orthwein A, Leung CC, Huang H, Landry MC, Kitevski-LeBlanc J, Noordermeer SM, Sicheri F, Durocher D.** 53BP1 is a reader of the DNA-damage-induced H2A Lys 15 ubiquitin mark. *Nature.* 2013; 499: 50-54. doi: 10.1038/nature12318
- Francisco-Morcillo J, Bejarano-Escobar R, Rodriguez-Leon J, Navascues J, Martin-Partido G.** Ontogenetic Cell Death and Phagocytosis in the Visual System of Vertebrates. *Dev Dyn.* 2014; 243: 1203-1225. doi: 10.1002/dvdy.24174
- Fritz AJ, Sehgal N, Pliss A, Xu J, Berezney R.** Chromosome territories and the global regulation of the genome. *Genes, Chromosomes and Cancer.* 2019; 58. doi: 10.1002/gcc.22732
- Fu Q y Wang PJ.** Mammalian piRNAs: biogenesis, function and mysteries. *Spermatogenesis.* 2014; 4: e27889. doi: 10.4161/spmg.27889
- Furumatsu T y Asahara H.** Histone acetylation influences the activity of Sox9-related transcriptional complex. *Acta Med Okayama.* 2010; 64: 351-357. doi: 10.18926/AMO/41320
- Furumatsu T, Tsuda M, Yoshida K, Taniguchi N, Ito T, Hashimoto M, Asahara H.** Sox9 and p300 cooperatively regulate chromatin-mediated transcription. *J Biol Chem.* 2005; 280: 35203-35208. doi: 10.1074/jbc.M502409200
- Furusawa T, Lim JH, Catez F, Birger Y, Mackem S, Bustin M.** Down-regulation of nucleosomal binding protein HMGN1 expression during embryogenesis modulates Sox9 expression in chondrocytes. *Mol Cell Biol.* 2006; 26: 592-604. doi: 10.1128/MCB.26.2.592-604.2006
- Fyodorov DV, Zhou B, Skoultchi AI, Bai Y.** Emerging roles of linker histones in regulating chromatin structure and function. *Nature Reviews Molecular Cell Biology.* 2018; 19: 192-206. doi: 10.1038/nrm.2017.94

- Gabay O, Zaal KJ, Sanchez C, Dvir-Ginzberg M, Gagarina V, Song Y, He XH, McBurney MW.** Sirt1-deficient mice exhibit an altered cartilage phenotype. *Joint Bone Spine*. 2013; 80: 613-620. doi: 10.1016/j.jbspin.2013.01.001
- Gagarina V; Gabay O, Dvir-Ginzberg M, Lee EJ, Brady JK, Quon MJ, Hall DJ.** Sirt1 enhances survival of human osteoarthritic chondrocytes by repressing protein tyrosine phosphatase 1B and activating the insulin-like growth factor receptor pathway. *Arthritis Rheum*. 2010; 62: 1383-1392. doi: 10.1002/art.27369
- Gañan Y, Macias D, Duterque-Coquillaud M, Ros MA, Hurle JM.** Role of TGF betas and BMPs as signals controlling the position of the digits and the areas of interdigital cell death in the developing chick limb autopod. *Development*. 1996; 122: 2349-2357
- Garcia-Martinez V, Macias D, Gañan Y, Garcia-Lobo JM, Francia MV, Fernandez-Teran MA, Hurle JM.** Internucleosomal DNA fragmentación and programmed cell death (apoptosis) in the interdigital tissue of the embryonic chick leg bud. *J Cell Sci*. 1993; 106: 201-108
- Garcia-Riart B, Lorda-Diez CI, Marin-Llera JC, Garcia-Porrero JA, Hurle JM, Montero JA.** Interdigital tissue remodelling in the embryonic limb involves dynamic regulation of the miRNA profiles. *J Anat*. 2017; 231: 275–286. doi: 10.1111/joa.12629
- Ge TT, Yang M, Chen Z, Lou G, Gu T.** *UHRF1* gene silencing inhibits cell proliferation and promotes cell apoptosis in human cervical squamous cell carcinoma CaSki cells. *J Ovarian Res*. 2016; 9: 42. doi: 10.1186/s13048-016-0253-8
- Ge YZ, Pu Mt, Gowher H, Wu HP, Dung JP, Jeltsch A, Xu GL.** Chromatin targeting of de novo DNA methyltransferases by the PWWP domain. *J Biol Chem*. 2004; 279: 25447-25454. doi:10.1074/jbc.M312296200
- Gerchman SE y Ramakrishnan V.** Chromatin higher-order structure studied by neutron scattering and scanning transmission electron microscopy. *PNAS* 1987; 84: 7802-7806. doi: 10.1073/pnas.84.22.7802

- Gerlitz G, Hock R, Ueda T, Bustin M.** The dynamics of HMG protein-chromatin interactions in living cells. *Biochem Cell Biol.* 2009; 87: 127-137. doi: 10.1139/O08-110
- Gluckman PD, Hanson Ma, Low FM.** The role of developmental plasticity and epigenetics in human health. *Birth Defects Res C Embryo Today.* 2011; 93: 12-18. doi: 10.1002/bdrc.20198
- Golberg AD, Allis Cd, Bernstein E.** Epigenetics: a landscape takes shape. *Cell.* 2007; 128: 635-638. doi: 10.1016/j.cell.2007.02.006
- Goldar S, Khaniani MS, Derakhshan SM, Baradarn, B.** Molecular mechanisms of apoptosis and roles in cancer development and treatment. *Asian Pac J Cancer Prev.* 2015; 16: 2129–2144. doi: 10.7314/apjcp.2015.16.6.2129
- Goldring MB, Tsuchimochi K, Ijiri K.** The control of chondrogenesis. *J Cell Biochem.* 2006; 97: 33-44. doi: 10.1002/jcb.20652
- Gong Z, Yang Q, Zeng Z, Zhang W, Li X, Zu X, Deng H, Chen P, Liao Q, Xiang B, Zhou M, Li Y, Xiong W, Li G.** An integrative transcriptomic analysis reveals p53 regulated miRNA, mRNA, and lncRNA networks in nasopharyngeal carcinoma. *Tumour Biol.* 2016; 37: 3683-3695. Doi:10.1007/s13277-015-4156-x
- Grandy RA, Whitfield TW, Wu H, Fitzgerald MP, VanOudenhove JJ, Zaidi SK, Montecino MA, Lian JB, van Wijnen AJ, Stein JL, Stein GS.** Genome-Wide Studies Reveal that H3K4me3 Modification in Bivalent Genes Is Dynamically Regulated during the Pluripotent Cell Cycle and Stabilized upon Differentiation. *Mol Cell Biol.* 2015; 36: 615-627. doi: 10.1128/MCB.00877-15
- Green DR.** The coming decade of cell death research: Five Riddles. *Cell.* 2019; 177: 1094-1107. doi:10.1016/j.cell.2019.04.024
- Green DR y Llambi F.** Cell death signaling. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 2015; 7. pii: a006080. doi: 10.1101/cshperspect.a006080
- Greer EL y Shi Y.** Histone methylation: a dynamic mark in health, disease and inheritance. *Nat Rev Genet.* 2012; 13: 343-357. doi: 10.1038/nrg3173

- Guérit D, Philipot D, Chuchana P, Toupet K, Brondello JM, Wein M, Jorgensen C, Noël D.** Sox9-regulated miRNA-574-3p inhibits chondrogenic differentiation of mesenchymal stem cells. *PLoS ONE*. 2013; 8: e62582. doi: 10.1371/journal.pone.0062582
- Guo JU, Su Y, Zhong C, Ming GL, Song H.** Emerging roles of TET proteins and 5-hydroxymethylcytosines in active DNA demethylation and beyond. *Cell Cycle*. 2011b; 10:2662–2668
- Haberland M, Montgomery RI, Olson EN.** The many roles of histone deacetylases in development and physiology: implications for disease and therapy. *Nat Rev Genet*. 2009; 10: 32-42. doi: 10.1038/nrg2485
- Hafner A, Bulyk ML, Jambhekar A, Lahav G.** The multiple mechanisms that regulate p53 activity and cell fate. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. 2019; 20: 199-210. doi: 10.1038/s41580-019-0110-x
- Hamburger V y Hamilton HL.** A series of normal stages in the development of the chick embryo. *Journal of morphology*. 1951; 88: 49-92
- Hanley DJ, Esteller M, Berdasco M.** Interplay between long non-coding RNAs and epigenetic machinery: emerging targets in cancer? *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*. 2018; 373: 20170074. doi: 10.1098/rstb.2017.0074
- Hansen JC, Connolly M, McDonald CJ, Pan A, Pryamkova A, Ray K, Seidel E, Tamura S, Rogge R, Maeshima K.** The 10-nm chromatin fiber and its relationship to interphase chromosome organization. *Biochem. Soc. Trans*. 2018; 46: 67–76. doi: 10.1042/BST20170101
- Haq SH.** 5-Aza-2'-deoxycytidine acts as a modulator of chondrocyte hypertrophy and maturation in chick caudal region chondrocytes in culture. *Anat Cell Biol*. 2016; 49: 107-115. doi: 10.5115/acb.2016.49.2.107
- Harrison JS, Cornett EM, Goldfarb D, DaRosa PA, Li ZM, Yan F, Dickson BM, Guo AH, Cantu DV, Kaustov L, Brown PJ, Arrowsmith CH, Erie DA, Major MB, Klevit RE, Krajewski K, Kuhlman B, Strahl BD, Rothbart SB.** Hemi-methylated DNA regulates DNA methylation inheritance through allosteric activation of H3 ubiquitylation by UHRF1. *Elife*. 2016; 5 pii: e17101. doi: 10.7554/eLife.17101

- Hashimoto H, Horton JR, Zhang X, Bostick M, Jacobsen SE, Cheng X.** The SRA domain of UHRF1 flips 5-methylcytosine out of the DNA helix. *Nature*. 2008; 455: 826–829. doi: 10.1038/nature07280
- Hassan M, Watari H, AbuAlmaaty A, Ohba Y, Sakuragi N.** Apoptosis and molecular targeting therapy in cancer. *BioMed Res Int*. 2014; 2014: 150845. doi: 10.1155/2014/150845
- Hata K, Takashima R, Amano K, Ono K, Nakanishi M, Yoshida M, Wakabayashi M, Matsuda A, Maeda Y, Suzuki Y, Sugano S, Whitson RH, Nishimura R, Yoneda T.** Arid5b facilitates chondrogenesis by recruiting the histone demethylase Phf2 to Sox9-regulated genes. *Nat Commun*. 2013; 4: 2850. doi: 10.1038/ncomms3850
- Hattori N, Imao Y, Nishino K, Hattori N, Ohgane J, Yagi S, Tanaka S, Shiota K.** Epigenetic regulation of Nanog gene in embryonic stem and trophoblast stem cells. *Genes Cells*. 2007; 12: 387-396. doi: 10.1111/j.1365-2443.2007.01058.x
- He YF, Li BZ, Liu P, Wang Y, Tang Q, Ding J, Jia Y, Chen Z, Li L, Sun Y, Li X, Dai Q, Song CX, Zhang K, He C, Xu GL.** Tet-mediated formation of 5-carboxylcytosine and its excision by TDG in mammalian DNA. *Science*. 2011; 333: 1303-1307. doi: 10.1126/science.1210944
- Hernández-Martínez R y Covarrubias L.** Interdigital cell death function and regulation: new insights on an old programmed cell death model. *Dev Growth Differ*. 2011; 53: 245-258. doi: 10.1111/j.1440-169X.2010.01246.x
- Hernández-Martínez R, Castro-Obregón S, Covarrubias L.** Progressive interdigital cell death: regulation by the antagonistic interaction between fibroblast growth factor 8 and retinoic acid. *Development*. 2009; 136: 3669-3678. doi: 10.1242/dev.041954
- Hernández-Segura A, Nehme J, Demaria M.** Hallmarks of cellular senescence. *Trends Cell Biol*. 2018; 2: 436-453. doi: 10.1016/j.tcb.2018.02.001
- Hervouet E, Peixoto P, Delage-Mourroux R, Boyer-Guittaut M, Cartron PF.** Specific or not specific recruitment of DNMTs for DNA methylation, an epigenetic dilemma. *Clinical Epigenetics*. 2018; 10: 17. doi: 10.1186/s13148-018-0540-y

- Hervouet E, Vallette FM, Cartron PF.** Dnmt3/transcription factor interactions as crucial players in targeted DNA methylation. *Epigenetics*. 2009; 4: 487–499. doi: 10.4161/epi.4.7.9883
- Hinchliffe JR.** Cell death in vertebrate limb morphogenesis. In: Harrison RJ, Navatnaram V, editors. *Progress in anatomy*. Cambridge: Cambridge University Press. 1982; P: 1-19
- Hino K, Saito A, Kido M, Kanemoto S, Asada R, Takai T, Cui M, Cui X, Imaizumi K.** Master regulator for chondrogenesis, Sox9, regulates transcriptional activation of the ER stress transducer BBF2H7/CREB3L2 in chondrocytes. *J Biological Chemistry*. 2014; 289: 13810-13820. doi: 10.1074/jbc.M113.543322
- Hoang TV, Horowitz ER, Chaffee BR, Qi P, Flake RE, Bruney DG, Rasor BJ, Rosalez SE, Wagner BD, Robinson ML.** Lens development requires DNMT1 but takes place normally in the absence of both DNMT3A and DNMT3B activity. *Epigenetics*. 2017; 12: 27-40. doi: 10.1080/15592294.2016.1253651
- Hoenicke L y Zender L.** Immune surveillance of senescent cells-biological significance in cancer -and non-cancer pathologies. *Carcinogenesis*. 2012; 33: 1123-1126. doi:10.1093/carcin/bgs124
- Hofstetter B, Niemierko A, Forrer C, Benhattar J, Albertini V, Pruschy M, Bosman FT, Catapano CV, Ciernik IF.** Impact of genomic methylation on radiation sensitivity of colorectal carcinoma. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*. 2010; 76: 1512-1519. doi: 10.1016/j.ijrobp.2009.10.037
- Holliday R.** Epigenetics: an overview. *Dev. Genetic*. 1994; 15: 453-457. doi: 10.1002/dvg.1020150602
- Hong S, Derfoul A, Pereira-Mouries L, Hall DJ.** A novel domain in histone deacetylase 1 and 2 mediates repression of cartilage-specific genes in human chondrocytes. *FASEB J*. 2009; 23: 3539-3552. doi: 10.1096/fj.09-133215
- Horejsí Z, Falck J, Bakkenist CJ, Kastan MB, Lukas J, Bartek J.** Distinct functional domains of Nbs1 modulate the timing and magnitude of ATM activation after low doses of ionizing radiation. *Oncogene*. 2004; 23: 3122-3127. doi: 10.1038/sj.onc.1207447

- Hu K y Olsen BR.** The roles of vascular endothelial growth factor in bone repair and regeneration. *Bone*. 2016; 91: 30–38. doi: 10.1016/j.bone.2016.06.013
- Hu W, Dooley J, Chung SS, Chandramohan D, Cimmino L, Mukherjee S, Mason CE, de Strooper B, Liston A, Park CY.** miR-29a maintains mouse hematopoietic stem cell self-renewal by regulating Dnmt3a. *Blood*. 2015; 125: 2206–2216. doi: 10.1182/blood-2014-06-585273
- Huertas P y Jackson SP.** Human CtIP mediates cell cycle control of DNA end resection and double strand break repair. *J Biol Chem*. 2009; 284: 9558–9565. doi: 10.1074/jbc.M808906200
- Hurle JM y Colvee E.** Surface changes in the embryonic interdigital epithelium during the formation of the free digits: a comparative study in the chick and duck foot. *J Embryol Exp Morphol*. 1982; 69: 251–63
- Hurle JM y Gañan Y.** Interdigital tissue chondrogenesis induced by surgical removal of the ectoderm in the embryonic chick leg bud. *J Embryol Exp Morphol*. 1986; 94: 231–244
- Hurle JM y Ojeda JL.** Cell death during the development of the truncus and conus of the chick embryo heart. *J Anat*. 1979; 129: 427–439
- Huth JR, Bewlwy CA, Nissen MS, Evans JN, Reeves R, Gronenborn AM, Clore GM.** The solution structure of an HMG-I(Y)-DNA complex defines a new architectural minor groove binding motif. *Nat Struct Biol*. 1997; 4: 657–665
- Ideno H, Shimada A, Imaizumi K, Kimura H, Abe M, Nakashima K, Nifuji A.** Predominant expression of H3K9 methyltransferases in prehypertrophic and hypertrophic chondrocytes during mouse growth plate cartilage development. *Gene Expr Patterns*. 2013; 13: 84–90. doi: 10.1016/j.gep.2013.01.002
- Inada M, Wang Y, Byrne MH, Rahman MU, Miyaura C, López-Otín C, Krane SM.** Critical roles for collagenase-3 (Mmp13) in development of growth plate cartilage and in endochondral ossification. *PNAS*. 2004; 101: 17192–17197. doi: 10.1073/pnas.0407788101

- Ishiyama SN, Matsumura R, Kawakami T, Mishima Y, Hojo H, Shimimura S, Ishikawa F, Tajima S, Tanaka K, Ariyoshi M, Shirakawa M, Ikeguchi M, Kidera A, Suetake I, Arita K, Nakanishi M.** Structure of the Dnmt1 reader module complexed with a unique two-mono-ubiquitin mark on histone H3 reveals the basis for DNA methylation maintenance. *Mol Cell*. 2017; 68: 350–360. doi: 10.1016/j.molcel.2017.09.037
- Ito MM y Kida MY.** Morphological and biochemical re-evaluation of the process of cavitation in the rat knee joint: cellular and cell strata alterations in the interzone. *J Anat*. 2000; 197: 659-679. doi: 10.1046/j.1469-7580.2000.19740659.x
- Ito S, D' Alessio AC, Taranova OV, Hong K, Sowers LC, Zhang Y.** Role of Tet proteins in 5mC to 5hmC conversion, ES-cell self-renewal and inner cell mass specification. *Nature*. 2010; 466: 1129-1133. doi: 10.1038/nature09303
- Izzo A y Schneider R.** H1 gets the genome in shape. *Genome Biology*. 2016; 17:8. doi:10.1168/s13059-016-0872-9
- Jackson SP y Bartek J.** The DNA damage response in human biology and disease. *Nature*. 2009; 461: 1071–1078. doi: 10.1038/nature08467
- Jacob V, Chernyavskaya Y, Chen X, Tan PS, Kent B, Hoshida Y, Sadler KC.** DNA hypomethylation induces a DNA replication-associated cell cycle arrest to block hepatic outgrowth in *Uhrf1* mutant zebrafish embryos. *Development*. 2015; 142: 510-521. doi: 10.1242/dev.115980
- Jadotte YT.** Epigenetics: The process of inheriting health disparities: implications for health professionals. *Book Social pathways to health vulnerability*. 2018. doi: 10.1007/978-3-319-93326-9_6
- Jensen ED, Gopalakrishnan R, Westerndorf JJ.** Bone morphogenetic protein 2 activates protein kinase D to regulate histone deacetylase 7 localization and repression of Runx2. *J Biol Chem*. 2009; 284: 2225-2234. doi: 10.1074/jbc.M800586200
- Jeon EJ, Lee KY, Choi NS, Lee MH, Kim HN, Jin YH, Ryoo HM, Choi JY, Yoshida M, Nishino N, Oh BC, Lee KS, Lee YH, Bae SC.** Bone morphogenetic protein-2 stimulates Runx2 acetylation. *J Biol Chem*. 2006; 281: 16502-16511. doi: 10.1074/jbc.M512494200

- Ji S, Zhu L, Gao Y, Zhang X, Yan Y, Cen J, Li R, Zeng R, Liao L, Hou C, Gao Y, Gao S, Wei G, Hui L.** Baf60b-mediated ATM-p53 activation blocks cell identity conversion by sensing chromatin opening. *Cell Research*. 2017; 27: 642-656. doi: 10.1038/cr.2017.36
- Jia D, Jurkowska RZ, Zhang X, Jeltsch A, Cheng X.** Structure of Dnmt3a bound to Dnmt3l suggest a model for de novo DNA methylation. *Nature*. 2007; 449: 248-251
- Jia Y, Li P, Fang L, Zhu H, Xu L, Cheng H, Zhang J, Li F, Feng Y, Li Y, Li J, Wang R, Du JX, Li J, Chen T, Ji H, Han J, Yu W, Wu Q, Wong J.** Negative regulation of DNMT3A de novo DNA methylation by frequently overexpressed UHRF family proteins as a mechanism for widespread DNA hypomethylation in cancer. *Cell Discov*. 2016; 2: 16007. doi: 10.1038/celldisc.2016.7
- Jiang Y, Woosley AN, Sivalingam N, Natarajan S, Howe PH.** Cathepsin-B-mediated cleavage of Disabled-2 regulates TGF- β -induced autophagy. *Nat. Cell Biol*. 2016; 18: 851-863. doi: 10.1038/ncb3388
- Jimenez-Useche I, Nurse NP, Tian Y, Kansara BS, Shim D, Yuan C.** DNA methylation effects on tetra-nucleosome compaction and aggregation. *Biophys J*. 2014; 107: 1629-1636. doi: 10.1016/j.bpj.2014.05.055
- Jones PA y Liang G.** Rethinking how DNA methylation patterns are maintained. *Nat Rev*. 2009; 10: 805–811. doi: 10.1038/nrg2651
- Jones PA.** Functions of DNA methylation: islands, start sites, gene bodies and beyond. *Nat Rev Genet*. 2012; 13: 484-492. doi: 10.1038/nrg3230
- Joti Y, Hikima T, Nishino Y, Kamada F, Hihara S, Takata H, Ishikawa T, Maeshima K.** Chromosomes without a 30nm-chromatin fiber. *Nucleus*. 2012; 3: 404-410. doi:10.4161/nucl.21222
- Jung HJ, Byun HO, Jee BA, Min S, Jeoun UW, Lee YK, Seo Y, Woo HG, Yoon G.** The Ubiquitin-like with PHD and Ring Finger Domains 1 (UHRF1)/DNA Methyltransferase 1 (DNMT1) Axis is a primary regulator of cell Senescence. *J Biol Chem*. 2017; 292: 3729-3739. doi: 10.1074/jbc.M116.750539

- Jung YC, Hong SJ, Kim YH, Kim SJ, Kang SJ, Choi SW, Rhyu MG.** Chromosomal losses are associated with hypomethylation of the gene-control regions in the stomach with a low number of active genes. *J Korean Med Sci.* 2008; 23: 1068-1089. doi: 10.3346/jkms.2008.6.1068
- Kang JS, Alliston T, Delston R, Derynck R.** Repression of Runx2 function by TGF-beta through recruitment of class II histone deacetylases by Smad3. *EMBO J.* 2005; 24: 2543-2555. doi: 10.1038/sj.emboj.7600729
- Karch J, Schips TG, Maliken BD, Brody MJ, Sargent MA, Kanisicak O, Molkentin JD.** Autophagic cell death is dependent on lysosomal membrane permeability through Bax and Bak. *Elife.* 2017; pii:e30543. doi: 10.7554/eLife.30543
- Kavanagh JN, Redmond KM, Schettino G, Prise KM.** DNA double strand break repair: a radiation perspective. *Antioxid Redox Signal.* 2013; 18: 2458-2472. doi: 10.1089/ars.2012.5151
- Ke FFS, Vanyai HK, Cowan AD, Delbridge ARD, Whitehead L, Grabow S, Czabotar PE, Voss AK, Strasser A.** Embryogenesis and adult life in the absence of intrinsic apoptosis effectors BAX, BAK, and BOK. *Cell.* 2018; 173: 1217–1230.e17. doi: 10.1016/j.cell.2018.04.036
- Kebede AF, Schneider R, Daujat S.** Novel types and sites of histone modifications emerge as players in the transcriptional regulation contest. *FEBS J.* 2015; 282: 1658–1674. doi: 10.1111/febs.13047
- Kerr JF, Wyllie AH, Currie AR.** Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer.* 1972; 26:239-257 doi: 10.1038/bjc.1972.33
- Khorasanizadeh S.** The nucleosome: from genomic organization to genomic regulation. *Cell.* 2004; 116: 259-272. doi: 10.1016/s0092-8674(04)00044-3
- Kim EJ y Um SJ.** SIRT1: roles in aging and cancer. *BMP Rep.* 2008; 41: 751-756. doi: 10.5483/bmbrep.2008.41.11.751
- Kim JK, Estève PO, Jacobsen SE, Pradhan S.** UHRF1 binds G9a and participates in p21 transcriptional regulation in mammalian cells. *Nucleic Acids Res.* 2009; 37: 493-505. doi: 10.1093/nar/gkn961

- Kimura H y Shiota K.** Methyl-CpG-binding protein, MeCP2, is a target molecule for maintenance DNA methyltransferase, Dnmt1. *J Biol Chem.* 2003; 278: 4806–4812. doi: 10.1074/jbc.M209923200
- Kimura H, Suetake I, Tajima S.** Exogenous expression of mouse Dnmt3 induces apoptosis in *Xenopus* early embryos. *J Biochem.* 2002; 131: 933-941. doi: 10.1093/oxfordjournals.jbchem.a003184
- Knudson CB.** Hyaluronan and CD44: strategic players for cell-matrix interactions during chondrogenesis and matrix assembly. *Birth Defects Res C Embryo Today.* 2003; 69: 174-196. doi: 10.1002/brdc.10013
- Koh HB, Scruggs AM, Huang SK.** Transforming Growth Factor- β 1 increases DNA methyltransferase 1 and -3a expression through distinct post-transcriptional mechanisms in lung fibroblasts. *JBC.* 2016; 291: 19287-19298. doi: 10.1074/jbc.M116.723080
- Kong X, Chen J, Xie W, Brown SM, Cai Y, Wu K, Fan D, Nie Y, Yegnasubramanian S, Tiedemann RL, Tao Y, Chiu Yen RW, Topper MJ, Zahnow CA, Easwaran H, Rothbart SB, Xia L, Baylin SB.** Defining UHRF1 domains that support maintenance of human colon cancer DNA methylation and oncogenic properties. *Cancer Cell.* 2019; 35: 633-648.e7. doi: 10.1016/j.ccell.2019.03.003
- Kornberg RD.** Chromatin structure: a repeating unit of histones and DNA. *Science.* 1974; 184: 868-871. doi: 10.1126/science.184.4139.868
- Korner U, Bustin M, Scheer U, Hock R.** Developmental role of HMGN proteins in *Xenopus laevis*. *Mech Dev.* 2003; 120: 1177-1192
- Kouzarides T.** Chromatin modifications and their function. *Cell.* 2007; 128: 693-705. doi: 10.1016/j.cell.2007.02.005
- Kufel J y Grzechnik P.** Small nucleolar RNAs tell a different tale. *Trends in Genetics.* 2019; 35: 104-117 doi: 10.1016/j.tig.2018.11.005
- Kuilman T y Peeper DS.** Senescence-messaging secretome: SMS-ing cellular stress. *Nat Rev Cancer.* 2009; 9: 81-94. doi: 10.1038/nrc2560
- Kumagai A, Lee J, Yoo HY, Dunphy WG.** TopBP1 activates the ATR-ATRIP complex. *Cell.* 2006; 124: 943-955. doi: 10.1016/h.cell.2005.12.041

- Kuramochi-Miyagawa S, Kimura T, Ijiri TW, Isobe T, Asada N, Fujita Y, Ikawa M, Iwai N, Okabe M, Deng W, Lin H, Matsuda Y, Nakano T.** Mili, a mammalian member of piwi family gene, is essential for spermatogenesis. *Development*. 2004; 131: 839–849. doi: 10.1242/dev.00973
- La Salle S, Mertineit C, Taketo T, Moens PB, Bestor TH, Trasler JM.** Windows for sex-specific methylation marked by DNA methyltransferase expression profiles in mouse germ cells. *Developmental Biology*. 2004; 268: 403-415. doi: 10.1016/j.ydbio.2003.12.031
- La Salle S, Oakes CC, Neaga OR, Bourc'his D, Bestor TH, Trasler JM.** Loss of spermatogonia and wide-spread DNA methylation defects in newborn male mice deficient in DNMT3L. *BMC Dev Biol*. 2007; 7: 104. doi: 10.1186/1471-213X-7-104
- Lallous N, Legrand P, McEwen AG, Ramon-Maiques S, Samama JP, Birck C.** The PHD finger of human UHRF1 reveals a new subgroup of unmethylated histone H3 tail readers. *PLoS One*. 2011; 6: e27599. doi: 10.1371/journal.pone.0027599
- Längst G y Manelyte L.** Chromatin Remodelers: From Function to dysfunction. *Genes (Basel)*. 2015; 6: 299-324. doi: 10.3390/genes6020299
- Lawson KA, Teteak CJ, Zou J, Hacquebord J, Ghatan A, Zielinska-Kwiatkowska A, Fernandes RJ, Chansky HA, Yang L.** Mesenchyme-specific knockout of ESET histone methyltransferase causes ectopic hypertrophy and terminal differentiation of articular chondrocytes. *J Biol Chem*. 2013; 288: 32119-32125. doi: 10.1074/jbc.M113.473827
- Leatherbarrow EL, Harper JV, Cucinotta FA, O'Neill P.** Induction and quantification of gamma-H2AX foci following low and high LET-irradiation. *Int J Radiat Biol*. 2006; 82: 111-118. doi: 10.1038/09553000600599783
- Lee HW, Suh JH, Kim AY, Lee YS, Park SY, Kim JB.** Histone deacetylase 1-mediated histone modification regulates osteoblast differentiation. *Mol Endocrinol*. 2006; 20: 2432-2443. doi: 10.1210/me.2006-0061

- Lehtonen S y Lehtonen E.** HMG-17 is an early marker of inductive interactions in the developing mouse kidney. *Differentiation*. 2001; 67: 154-163. doi: 10.1046/j.1432-0436.2001.670407.x
- Lei H, Oh SP, Okano M, Jüttermann R, Goss KA, Jaenisch R, Li E.** De novo DNA cytosine methyltransferase activities in mouse embryonic stem cells. *Development*. 1996; 122: 3195-3205
- Lemieux ME, Yang X, Jardine K, He X, Jacobsen KX, Staines WA, Harper ME, McBurney MW.** The Sirt1 deacetylase modulates the insulin-like growth factor signaling pathway in mammals. *Mech Ageing Dev*. 2005; 126: 1097-1105. doi: 10.1016/j.mad.2005.04.006
- Letai A, Bassik MC, Walensky LD, Sorcinelli MD, Weiler S, Korsmeyer SJ.** Distinct BH3 domains either sensitize or activate mitochondrial apoptosis, serving as prototype cancer therapeutics. *Cancer Cell*. 2002; 2: 183–192.
- Li B, Carey M, Workman JL.** The role of chromatin during transcription. *Cell*. 2007; 128: 707-719. doi: 10.1016/j.cell.2007.01.015
- Li E, Bestor TH, Jaenisch R.** Targeted mutation of the DNA methyltransferase gene results in embryonic lethality. *Cell*. 1992; 69: 915-926. doi:10.1016/0092-8674(92)90611-f
- Li Y, Liu Y, Chiang J, Huang F, Li Y, Li X, Ning Y, Zhang W, Deng H, Chen YG.** DNA damage activates TGF- β signaling via ATM-c-Cbl-mediated stabilization of the type II receptor T β RII. *Cell Reports*. 2019; 28: 735–745. doi: 10.1016/j.celrep.2019.06.045
- Li Z, Dai H, Martos SN, Xu B, Gao Y, Li T, Zhu G, Schones DE, Wang Z.** Distinct roles of DNMT1-dependent and DNMT1-independent methylation patterns in the genome of mouse embryonic stem cells. *Genome Biol*. 2015; 16: 115. doi: 10.1186/s13059-015-0685-2
- Liao J, Karnik R, Gu H, Ziller MJ, Clement K, Tsankov AM, Akopian V, Gifford CA, Donaghey J, Galonska C, Pop R, Reyon D, Tsai SQ, Mallard W, Joung JK, Rinn JL, Gnirke A, Meissner A.** Targeted disruption of DNMT1, DNMT3A and DNMT3B in human embryonic stem cells. *Nat Genet*. 2015; 47: 469–478. doi: 10.1038/ng.3258

- Lienert F, Wirbelauer C, Som I, Dean A, Mohn F, Schübeler D.** Identification of genetic elements that autonomously determine DNA methylation states. *Nat Genet.* 2011. 43: 1091-1097. doi: 10.1038/ng.946
- Lim JH, Catez F, Birger Y, West KL, Prymakowska-Bosak M, Postnikov YV, Bustin M.** Chromosomal protein HMGN1 modulates histone H3 phosphorylation. *Mol Cell.* 2005; 15: 573-584. doi: 10.1016/j.molcel.2004.08.006
- Ling C y Groop L.** Epigenetics: a molecular link between environmental factors and type 2 diabetes. *Diabetes.* 2009; 58: 2718-2725. doi: 10.2337/db09-1003
- Liu H, Su D, Zhang J, Ge S, Li Y, Wang F, Gravel M, Roulston A, Song Q, Xu W, Liqng JG, Shore G, Wang X, Liang P.** Improvement of pharmacokinetic profile of TRAIL via Trimer-Tag enhances its antitumor activity in vivo. *Sci. Rep.* 2017; 7: 8953. doi: 10.1038/s41598-017-09518-1
- Liu J, Zhang S, Cheng B.** Epigenetic roles of PIWI-interacting RNAs (piRNAs) in cancer metastasis. *Oncol Rep.* 2018; 40: 2423-2434. doi: 10.3892/or.2018.6684
- Liu X, Li F, Huang Q, Zhang Z, Zhou L, Deng Y, Zhou M, Fleenor DE, Wang H, Kastan MB, Li CY.** Self-inflicted DNA double-strand breaks sustain tumorigenicity and stemness of cancer cells. *Cell Res.* 2017; 27: 764–783. doi: 10.1038/cr.2017.41
- Liu Y, Li G, Zhang J.** The role of long non-coding RNA H19 in musculoskeletal system: a new player in an old game. *Exp Cell Res.* 2017; 360: 61-65. doi: 10.1016/j.yexcr.2017.09.007
- Livak KJ y Schmittgen TD.** Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods.* 2001; 25: 402-408. doi: 10.1006/meth.2001.1262
- Lolli A, Narcisi R, LAmbertini E, penolazzi L, Angelozzi M, Kops N, Gasparini S, van Osch GJ, Piva R.** Silencing of antichondrogenic microRNA-221 in human mesenchymal stem cells promotes cartilage repair in vivo. *Stem Cells.* 2016; 34: 1801-1811. doi: 10.1002/stem.2350

- Lomonosova E y Chinnadurai G.** BH3-only proteins in apoptosis and beyond: an overview. *Oncogene*. 2008; 27 Suppl1:S2-19. doi: 10.1038/onc.2009.39
- Long F y Ornitz DM.** Development of the endochondral skeleton. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 2013; 5: a008334. doi: 10.1101/cshperspect.a008334
- Lopez J y Tait SWG.** Mitochondrial apoptosis: Killing cancer using the enemy within. *Br. J. Cancer*. 2015; 112: 957–962. doi: 10.1038/jbc.2015.85
- Lorda-Diez CI, Garcia-Riart B, Montero JA, Rodriguez-León J, Garcia-Porrero JA, Hurle JM.** Apoptosis during embryonic tissue remodeling is accompanied by cell senescence. *Aging*. 2015a; 7: 974–985. doi:10.18632/aging.100844
- Lorda-Diez CI, Montero JA, Diaz-Mendoza MJ, Garcia-Porrero JA, Hurle JM.** Defining the earliest transcriptional steps of chondrogenic progenitor specification during the formation of the digits in the embryonic limb. *PLoS One*. 2011; 6: e24546. doi: 10.1371/journal.pone.0024546
- Lorda-Diez CI, Montero JA, Garcia-Porrero JA, Hurle JM.** Interdigital tissue regression in the developing limb of vertebrates. *Int J Dev Biol*. 2015b; 59: 55-62. doi: 10.1387/ijdb.150065jh
- Lou Z, Minter-Dykhouse K, Franco S, Gostissa M, Rivera MA, Celeste A, Manis JP, van Deursen J, Nussenzweig A, Paull TT, Alt FW, Chen J.** MDC1 maintains genomic stability by participating in the amplification of ATM-dependent DNA damage signals. *Mol Cell*. 2006; 21: 187-200. doi: 10.1016/j.molcel.2005.11.025
- Lowe D, Horvath S, Raj K.** Epigenetic clock analyses of cellular senescence and ageing. *Oncotarget*. 2016; 7: 8524–8531. doi:10.18632/oncotarget.7383
- Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ.** Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem*. 1951; 193: 265-275
- Lu C, Zhu F, Cho YY, Tang F, Zykova T, Ma WY, Bode AM, Dong Z.** Cell apoptosis: requirement of H2AX in DNA ladder formation, but not for the activation of caspase-3. *Mol Cell*. 2006; 23: 121–132. doi: 10.1016/j.molcel.2006.05.023
- Lu H y Hallstrom TC.** The nuclear protein UHRF2 is a direct target of the transcription factor E2F1 in the induction of apoptosis. *J Biol Chem*. 2013; 288: 23833-23843. doi: 10.1047/jbc-M112.447276

- Lui JC, Garrison P, Nguyen Q, Keembiyehetty M, AdC, Chen W, Jee YH, Landman E, Nilsson O, Barnes KM, Baron J.** EZH1 and eZH2 promote skeletal growth by repressing inhibitors of chondrocyte proliferation and hypertrophy. *Nat Commun.* 2016; 7: 13685. doi: 10.1038/ncomms13685
- Luke JJ, Van De Wetering CI, Knudson CM.** Lymphoma development in Bax transgenic mice is inhibited by Bcl-2 and associated with chromosomal instability. *Cell Death Differ.* 2003; 10: 740–748. doi: 10.1038/sj.cdd.4401233
- Luzhna L y Kovalchuk O.** Modulation of DNA methylation levels sensitizes doxorubicin-resistant breast adenocarcinoma cells to radiation-induced apoptosis. *Biochem Biophys Res Commun.* 2010; 392: 113–117. doi: 10.1016/j.bbrc.2009.12.093
- Maas C, Verbrugge I, de Vries E, Savich G, van de Kooji LW, Tait SW, Borst J.** Smac/DIABLO release from mitochondria and XIAP inhibition are essential to limit clonogenicity of Type I tumor cells after TRAIL receptor stimulation. *Cell Death Differ.* 2010; 17: 1613–1623. doi: 10.1038/cdd.2010.39
- Maatouk DM, Choi KS, Bouldin CM, Harfe BD.** In the limb AER Bmp2 and Bmp4 are required for dorsal-ventral patterning and interdigital cell death but not limb outgrowth. *Dev Biol.* 2009; 327: 516–523. doi: 10.1016/j.ydbio.2009.01.004
- Macias D, Gañan Y, Sampath TK, Piedra ME, Ros NA, Hurlle JM.** Role of BMP-2 and OP-1 (BMP-7) in programmed cell death and skeletogenesis during chick limb development. *Development.* 1997; 124: 1109–1117
- Mailand N, Bekker-Jensen S, Faustrup H, Melander F, Bartek J, Lukas C, Lukas J.** RNF8 ubiquitylates histones at DNA double-strand breaks and promotes assembly of repair proteins. *Cell.* 2007; 131: 887–900. doi: 10.1016/j.cell.2007.09.040
- Majka J, Niedziela-Majka A, Burgers PM.** The checkpoint clamp activates Mec1 kinase during initiation of the DNA damage checkpoint. *Mol Cell.* 2006; 24: 891–901. doi: 10.1016/j.molcel.2006.11.027

- Malaquin N, Carrier-Leclerc A, Dessureault M, Rodier F.** DDR-mediated crosstalk between DNA-damage cells and their microenvironment. *Front. Genet.* 2015; 6: 94. doi: 10.3389/fgene.2015.00094
- Malone Cd y Hannon GJ.** Small RNAs as guardians of the genome. *Cell.* 2009; 136: 656-668. doi: 10.1016/j.cell.2009.01.045
- Manakov SA, Pezic D, Marinov GK, Pastor WA, Sachidanandam R, Aravin AA.** MIWI2 and MILI Have Differential Effects on piRNA Biogenesis and DNA Methylation. *Cell Rep.* 2015; 12: 1234-1243. doi: 10.1016/j.celrep.2015.07.036
- Maresca A, Zaffagnini M, Caporali L, Carelli V, Zanna C.** DNA methyltransferase 1 mutations and mitochondrial pathology: is mtDNA methylated? *Front Genet.* 2015; 6:90. doi: 10.3389/fgene.2015.00090
- Mariani FV y Martin GR.** Deciphering skeletal patterning: clues from the limb. *Nature.* 2003; 423: 319-325. doi: 10.1038/nature01655
- Martín-Oliva D, Martín-Guerrero SM, Matia-González AM, Ferrer-Martín RM, Martín-Estebané M, Carrasco MC, Sierra A, Marín-Teva JL, Calvente R, Navascués J, Cuadros MA.** *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2015; 56: 1301-1309. doi: 10.1167/iovs.14-15828
- McCulloch DR, Nelson CM, Dixon LJ, Silver DL, Wyllie JD, Lindner V, Sasaki T, Cooley MA, Argraves WS, Apte SS.** ADAMTS metalloproteases generate active versican fragments that regulate interdigital web regression. *Dev Cell.* 2009; 17: 687-698. doi: 10.1016/j.devcel.2009.09.008
- McGinty RK y Tan S.** Nucleosome structure and function. *Chem Rev.* 2015; 115: 2255-2273. doi:10.1021/r500373h
- McLean CM, Karemaker ID, van Leeuwen F.** The emerging roles of DOTL1 in leukemia and normal development. *Leukemia.* 2014. 28: 2131-2138. doi:10.1038/leu.2014.169
- Meier P y Vousden KH.** Lucifer's labyrinth--ten years of path finding in cell death. *Mol Cell.* 2007; 28: 746-754. doi: 10.1016/j.molcel.2007.11.016
- Merika M y Thanos D.** Enhanceosomes. *Curr Opin Genet Dev.* 2001; 11: 205-208.

- Merino R, Gañan Y, Macias D, Economides AN, Sampath KT, Hurlé JM.** Morphogenesis of digits in the avian limb is controlled by FGFs, TGFbetas and noggin through BMP signaling. *Dev Biol.* 1998; 200: 35-45. doi: 10.1006/dbio.1998.8946
- Merino R, Rodriguez-Leon J, Macias D, Ganán Y, Economides AN, Hurlé JM.** The BMP antagonist Gremlin regulates outgrowth, chondrogenesis and programmed cell death in the developing limb. *Development.* 1999; 126: 5515-5522
- Merkenschlager M y Nora EP.** CTCF and cohesion in genome folding and transcriptional gene regulation. *Annu. Rev. Genomics Hum. Genet.* 2016; 17: 17-43. doi:10.1146/annurev-genom-083115-022339. Review
- Mikkelsen TS, Ku M, Jaffe DB, Issac B, Lieberman E, Giannoukos G, Alvarez P, Brockman W, Kim TK, Koche RP, Lee W, Mendenhall E, O'Donovan A, Presser A, Russ C, Xie X, Meissner A, Wernig M, Jaenisch R, Nusbaum C, Lander ES, Bernstein BE.** Genome-wide maps of chromatin state in pluripotent and lineage-committed cells. *Nature.* 2007; 448: 553-60. doi: 10.1038/nature06008
- Min JN, Tian Y, Xiao Y, Wu L, Li L, Chang S.** The mINO80 chromatin remodeling complex is required for efficient telomere replication and maintenance of genome stability. *Cell Res.* 2013; 23: 1396–1413. doi: 10.1038/cr.2013.113
- Mladenov E e Iliakis G.** Induction and repair of DNA double strand breaks: the increasing spectrum of non-homologous end joining pathways. *Mutat Res.* 2011; 711: 61-72. doi: 10.1016/j.mrfmmm.2011.02.005
- Mohn F, Weber M, Rebhan M, Roloff TC, Richter J, Stadler MB, Bibel M, Schübeler D.** Lineage-specific polycomb targets and de novo DNA methylation define restriction and potential of neuronal progenitors. *Mol Cell.* 2008; 30: 755-766. doi: 10.1016/j.molcel.2008.05.007
- Montero JA y Hurlé JM.** Sculpturing digit shape by cell death. *Apoptosis.* 2010; 15: 365-375. doi: 10.1007/s10495-009-0444-5

- Montero JA, Lorda-Diez CI, Certal AC, Moreno N, Rodriguez-Leon J, Torriglia A, Hurle JM.** Coordinated and sequential activation of neutral and acidic DNases during interdigital cell death in the embryonic limb. *Apoptosis*. 2010; 15: 1197–1210. doi: 10.1007/s10495-010-0523-7
- Montero JA, Sanchez-Fernandez C, Lorda-Diez CI, Garcia-Porrero JA, Hurle JM.** DNA damage precedes apoptosis during the regression of the interdigital tissue in vertebrate embryos. *Sci Rep*. 2016; 6: 35478. doi:10.1038/srep35478
- Morris KV, Chan SW, Jacobsen SE, Looney DJ.** Small interfering RNA-induced transcriptional gene silencing in human cells. *Science*. 2004a; 305: 1289–1292. doi: 10.1126/science.1101372
- Morrison AJ, Hughland J, Krogan NJ, Arbel-Eden A, Greenblatt JF, Haber JE, Shen X.** INO80 and gamma-H2AX interaction links ATP-dependent chromatin remodeling to DNA damage repair. *Cell*. 2004; 119: 767–775. doi: 10.1016/j.cell.2004.11.037
- Mortusewicz O, Schermelleh L, Walter J, Cardoso Mc, Leonhardt H.** Recruitment of DNA methyltransferase I to DNA repair sites. *PNAS*. 2005; 102: 8905-8909. doi: 10.1073/pnas.0501034102
- Muñoz-Espín D, Cañamero M, Maraver A, Gómez-López G, Contreras J, Murillo-Cuesta S, Rodríguez-Baeza A, Varela-Nieto I, Ruberte J, Collado M, Serrano M.** Programmed cell senescence during mammalian embryonic development. *Cell*. 2013; 155: 1104-1118. doi: 10.1016/j.cell.2013.10.019
- Murawska M y Brehm A.** CHD chromatin remodelers and the transcription cycle. *Transcription*. 2011; 2: 244–253. doi: 10.4161/tms.2.6.17840
- Muto M, Kanari Y, Kubo E, Takabe T, Kurihara T, Fujimori A, Tatsumi K.** Targeted disruption of Np95 gene renders murine embryonic stem cells hypersensitive to DNA damaging agents and DNA replication blocks. *J Biol Chem*. 2002; 277: 34549–34555. doi: 10.1074/jbc.M205189200
- Nakamura AJ, Rao VA, Pommier Y, Bonner WM.** The complexity of phosphorylated H2AX foci formation and DNA repair assembly at DNA double-strand breaks. *Cell Cycle*. 2010; 9: 389-397. doi: 10.4161/cc.9.2.10475

- Narita M.** Cellular senescence and chromatin organisation. *Br J Cancer*. 2007; 96: 686-691. doi: 10.1038/sj.bjc.6603636
- Negishi M, Chiba T, Saraya A, Miyagi S, Iwama A.** Dmap1 plays an essential role in the maintenance of genome integrity through the DNA repair process. *Genes Cells*. 2009; 14: 1347–1357. doi: 10.1111/j.1365-2443.2009.01352.x
- Nishida K, Yamaguchi O, Otsu K.** Crosstalk between autophagy and apoptosis in heart disease. *Circ Res*. 2008; 103: 343–351. doi:10.1161/CIRCRESAHA.108.175448
- Nishida N, Kudo M, Nishimura T, Arizumi T, Takita M, Kitai S, Yada N, Hagiwara S, Inoue T, Minami Y, Ueshima K, Sakurai T, Yokomichi N, Nagasaka T, Goel A.** Unique association between global DNA hypomethylation and chromosomal alterations in human hepatocellular carcinoma. *PLoS One*. 2013; 8: e72312. doi: 10.1371/journal.pone.0072312
- Nishino Y, Eltsov M, Joti Y, Ito K, Takata H, Takahashi Y, Hihara S, Fragakis AS, Imamoto N, Ishikawa T, Maeshima K.** Human mitotic chromosome consist predominantly of irregularly folded nucleosome fibres without a 30-nm chromatin structure. *EMBO J*. 2012; 31: 1644-1653. doi:10.1038/emboj.2012.35
- Nishiyama A, Yamaguchi L, Sharif J, Johmura Y, Kawamura T, Nakanishi K, Shimamura S, Arita K, Kodama T, Ishikawa F, Koseki H, Nakanishi M.** Uhrf1-dependent H3K23 ubiquitylation couples maintenance DNA methylation and replication. *Nature*. 2013; 502: 249-53. doi: 10.1038/nature12488
- Nozaki T, Imai R, Tanbo M, Nagashima R, Tamura S, Tani T, Joti Y, Tomita M, Hibino K, Kanemaki MT, Wendt Ks, Okada Y, Nagai T, Maeshima K.** Dynamic organization of chromatin domains revealed by super-resolution live-cell imaging. *Mol Cell*. 2017; 67: 282-293-e7. doi: 10.1016/j.molcel.2017.06.018
- O'Brien J, Hayder H, Zayed Y, Peng C.** Overview of microRNA biogenesis, mechanisms of actions and circulation. *Front Endocrinol (Lausanne)*. 2018; 9: 402. doi: 10.3389/fendo.2018.00402

- O'Donnell AH, Edwards JR, Rollins RA, Vander Kraats ND, Su T, Hibshoosh HH, Bestor TH.** Methylation abnormalities in mammary carcinoma: the methylation suicide hypothesis. *J Cancer Ther.* 2014; 5: 1311–1324. doi: 10.4236/jct.2014.514131
- Obata Y, Furusawa Y, Endo TA, Sharif J, Takahashi D, Atarashi K, Nakayama M, Onawa S, Fujimura Y, Takahashi M, Ikawa T, Otsubo T, Kawamura YI, Dohi T, Tajima S, Masumoto H, Ohara O, Honda K, Hori S, Ohno H, Koseki H, Hase K.** The epigenetic regulator Uhrf1 facilitates the proliferation and maturation of colonic regulatory T cells. *Nat Immunol.* 2014; 15: 571-579. doi: 10.1038/ni.2886
- Oberlender SA y Tuan RS.** Expression and functional involvement of N-cadherin in embryonic limb chondrogenesis. *Development.* 1994; 120: 177-187
- Oesterreich FC, Herzel L, Straube K, Hujer K, Howard J, Neugebauer KM.** Splicing of nascent RNA coincides with intron exit from RNA polymerase II. *Cell.* 2016; 165: 372–381. doi: 10.1016/j.cell.2016.02.045
- Oh Y y Chung KC.** UHRF2, a ubiquitin E3 ligase, acts as a small ubiquitin-like modifier E3 ligase for zinc finger protein 131. *J Biol Chem.* 2013; 288: 9102-9111. doi: 10.1074/jbc.M112.438234
- Oh YS, Jeong SG, Cho GW.** Anti-senescence effects of DNA methyltransferase inhibitor RG108 in human bone marrow mesenchymal stromal cells. *Biotechnol Appl Biochem.* 2015; 62: 583-590. doi:10.1002/bab.1393
- Olins AL y Olins DE.** Spheroid chromatin units (v bodies). *Science.* 1974; 183: 330-332. doi: 10.1126/science.183.4122.330
- Onyekwelu I, Goldring MB, Hidaka C.** Chondrogenesis, joint formation and articular cartilage regeneration. *J Cell Biochem.* 2009; 107: 383-392. doi: 10.1002/jcb.22149
- Oppenheimer H, Gabay O, Meir H, Haze A, Kandel L, Liebergall M, Gagarina V, Lee EJ, Dvir-Ginzberg M.** 75-kd sirtuin1 blocks tumor necrosis factor α -mediated apoptosis in human osteoarthritic chondrocytes. *Arthritis Rheum.* 2012; 64: 718-728. doi: 10.1002/art.33407
- Ozata DM, Gainetdinov I, Zoch A, O'carroll D, Zamore PD.** PIWI-interacting RNAs: small RNAs with big functions. *Natures Reviews Genetics.* 2019; 20: 89-108. doi: 10.1038/s41576-018-0073-3

- Pajni-Underwood S, Wilson CP, Elder C, Mishina Y, Lewandoski M.** BMP signals control limb bud interdigital programmed cell death by regulating FGF signaling. *Development*. 2007; 134: 2359-2368. doi: 10.1242/dev.001677
- Palanca, A.** Respuesta de las neuronas sensitivas al estrés genotóxico inducido por radiaciones ionizantes y por la inhibición del proteasoma. 2014
- Palazzo AF y Lee ES.** Non-coding RNA: what is functional and what is junk? *Frontiers in Genetics*. 2015; 6:2. doi: 10.3389/fgene.2015.00002
- Palla VV, Karaolanis G, Katafigiotis I, Anastosiou I, Patapis P, Dimitroulis D, Perrea D.** Gamma-H2AX: can it be established as a classical cancer prognostic factor? *Tumour Biol*. 2017; 39: 1010428317695931. doi: 10.1177/1010428317695931
- Pan Y, Daito T, Sasaki Y, Chung YH, Xing X, Pondugula S, Swamidass SJ, Wang T, Kim AH, Yano H.** Inhibition of DNA methyltransferases blocks mutant huntingtin-induced neurotoxicity. *Sci Rep*. 2016; 6: 31022. doi: 10.1038/srep31022
- Pan Y, Liu Z, Shen J, Kopan R.** Notch1 and 2 cooperate in limb ectoderm to receive an early Jagged2 signal regulating interdigital apoptosis. *Dev Biol*. 2005; 286: 472-482. doi: 10.1016/j.ydbio.2005.08.037
- Panamarova M, Cox A, Wicher KB, Butler R, Bulgakova N, Jeon S, Rosen B, Seong RH, Skarnes W, Crabtree G, Zernicka-Goetz M.** The BAF chromatin remodeling complex is an epigenetic regulator of lineage specification in the early mouse embryo. *Development*. 2016; 143: 1271-1283. doi: 10.1242/dev.131961
- Panier S y Boulton SJ.** Double-strand break repair: 53BP1 comes into focus. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. 2013; 15: 7–18. doi:10.1038/nrm3719
- Pannunzio NR, Watanabe G, Lieber MR.** Nonhomologous DNA end-joining for repair of DNA double-strand breaks. *J. Biol Chem*. 2018; 293: 10512-10523. doi: 10.1074/jbc.TM117.000374
- Papaoannaou G, Mirzamohammadi F, Lisse TS, Nishimori S, Wein MN, Kobayashi T.** MicroRNA-140 provides robustness to the regulation of hypertrophic chondrocyte differentiation by the PTHrP-HDAC4 pathway. *J Bone Miner Res*. 2015; 30: 1044-1052. doi: 10.1002/jbmr.2438.

- Papait R, Pistore C, Negri D, Pecoraro D, Cantarini L, Bonapace IM.** Np95 is implicated in pericentromeric heterochromatin replication. *Mol Biol Cell*. 2007; 18: 1098-1106. doi: 10.1091/mbc.e06-09-0874
- Park SJ, Shirahige K, Ohsugi M, Nakai K.** DBTMEE: a database of transcriptome in mouse early embryos. *Nucleic Acids Res*. 2015; 43: 771-776. doi: 10.1093/nar/gku1001
- Patel A, Chakravarthy S, Morrone S, Nodelman IM, McKnight JN, Bowman GD.** Decoupling nucleosome recognition from DNA binding dramatically alters the properties of the Chd1 chromatin remodeler. *Nucleic Acids Res*. 2013; 41: 1637-1648. doi: 10.1093/nar/gks1440
- Patnaik D, Estève PO, Pradhan S.** Targeting the SET and RING-associated (SRA) domain of ubiquitin-like, PHD and ring finger-containing 1 (UHRF1) for anti-cancer drug development. *Oncotarget*. 2018; 9: 26243-26258. doi: 10.18632/oncotarget.25425
- Phillips T y Shaw K.** Chromatin Remodeling in eukaryotes. *Nature Education*. 2008; 1: 209
- Pieur A, Besnard E, Babled A, Lemaitre JM.** P53 and p16(INK4A) independent induction of senescence by chromatin-dependent alteration of S-phase progression. *Nat Commun*. 2011; 2: 473. doi: 10.1038/ncomms1473
- Pitsillides AA y Ashhurst DE.** A critical evaluation of specific aspects of joint development. *Dev Dyn*. 2008; 237: 2284-2294. doi: 10.1002/dvdy.21654
- Pray-Grant MG, Daniel JA, Schieltz D, Yates JR 3rd, Grant PA.** Chd1 chromodomain links histone H3 methylation with SAGA-and SLIK-dependent acetylation. *Nature*. 2005; 433: 434-438. doi: 10.1038/nature03242
- Price BD y D'Andrea AD.** Chromatin remodeling at DNA double-strand breaks. *Cell*. 2013; 152: 1344-1354. doi: 10.1016/j.cell.2013.02.011
- Rai K, Huggins IJ, James SR, Karpf AR, Jones DA, Cairns BR.** DNA demethylation in zebrafish involves the coupling of a deaminase, a glycosylase, and gadd45. *Cell*. 2008; 135: 1201-1212. doi: 10.1016/j.cell.2008.11.042
- Ransohoff JD, Wei Y, Khavari PA.** The functions and unique features of long intergenic non-coding RNA. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2018; 19: 143-157. doi:10.1038/nrm.2017.104

- Rasmussen KD y Helin K.** Role of TET enzymes in DNA methylation, development, and cancer. *Genes Dev.* 2016; 30: 733–750. doi: 10.1101/gad.276568.115
- Razin SV y Gavrilov AA.** Structural-functional domains of the eukaryotic genome. *Biochemistry (Mosc).* 2018; 83: 302–312. doi: 10.1134/S0006297918040028. Review
- Razin SV, Gavrilov AA, Vassetzky YS, Ulianov SV.** Topologically-associating domains: gene warehouse adapted to serve transcriptional regulation. *Transcription.* 2016; 7: 84–90. doi: 10.1080/21541263.2016.1181489. Review
- Reeves R.** HMGA proteins: flexibility finds a nuclear niche? *Biochem Cell Biol.* 2003; 81: 185–195. doi: 10.1139/o03-044
- Reik W.** Stability and flexibility of epigenetic gene regulation in mammalian development. *Nature.* 2007; 447: 425–432. doi: 10.1038/nature05918
- Rich T, Allen RL, Wyllie AH.** Defying death after DNA damage. *Nature.* 2000; 407: 777–783. doi: 10.1038/35037717
- Rinaldi L, Datta D, Serrat J, Morey L, Solanas G, Avgustinova A, Blanco E, Pons JI, Matallanas D, Von Kriegsheim A, Di Croce L, Benitah SA.** Dnmt3a and Dnmt3b associate with enhancers to regulate human epidermal stem cell homeostasis. *Cell Stem Cell.* 2016; 19: 491–501. doi: 10.1016/j.stem.2016.06.020
- Rinn JL, Kertesz M, Wang JK, Squazzo SL, Xu X, Brugmann SA, Goodnough H, Helms JA, Farnjam PJ, Segal E, Chang HY.** Functional demarcation of active and silent chromatin domains in human HOX loci by noncoding RNAs. *Cell.* 2007; 129: 1311–1323. doi: 10.1016/j.cell.2007.05.022
- Rodier F, Muñoz DP, Teachenor R, Chu V, Le O, Bhaumik D, Coppé JP, Campeau E, Beauséjour CM, Kim SH, Davalos AR, Campisi J.** DNA-SCARS: distinct nuclear structures that sustain damage-induced senescence growth arrest and inflammatory cytokine secretion. *J Cell Sci.* 2011; 124: 68–81. doi: 10.1242/jcs.071340
- Rodriguez-Leon J, Merino R, Macias D, Gañan Y, Santesteban E, Hurlé JM.** Retinoic acid regulates programmed cell death through BMP signalling. *Nat Cell Biol.* 1999; 1: 125–126. doi:10.1038/10098

- Rowley MJ, Nichols MH, Lyu Z, Ando-kuri M, Rivera ISM, Hermetz K, Wang P, Ruan Y, Corces VG.** Evolutionarily conserved principles predict 3D chromatin organization. *Mol Cell*. 2017; 67: 837-852.e7. doi: 10.1016/j.molcel.2017.07.022
- Russo VEA, Martienssen RA, Riggs AD.** Epigenetic mechanisms of gene regulation. *Cold Spring Harbor Laboratory Press*. 1996. ISBN 0 87969 490 4
- Saha A, Wittmeyer J, Cairns BR.** Chromatin remodelling: The industrial revolution of DNA around histones. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2006; 7:437–447. doi: 10.1038/nrm1945
- Sahakyan A, Yang Y, Plath K.** The role of Xist in X-chromosome dosage compensation. *Trends in Cell biology*. 2018; 28: 999-1013. doi: 10.1016/j.tcb.2018.05.005
- Salas-Vidal E, Valencia C, Covarrubias L.** Differential tissue growth and patterns of cell death in mouse limb autopod morphogenesis. *Dev Dyn*. 2001; 220: 295–306. doi: 10.1002/dvdy.1108
- Santos-Rosa H, Schneider R, Bernstein BE, Karabetsou N, Morillon A, Weise C, Schreiber SL, Mellor J, Kouzarides T.** Methylation on histone H3 K4 mediates association of the Isw1p ATPase with chromatin. *Molecular Cell*. 2003; 12: 1325-1332. doi: 10.1016/j.molcel.2018.05.012
- Saxonov S, Berg P, Brutlag DL.** A genome-wide analysis of CpG dinucleotides in the human genome distinguishes two distinct classes of promoters. *PNAS*. 2006; 103: 1412-1417. doi: 10.1073/pnas.0510310103
- Scaffidi P, Misteli T, Bianchi ME.** Release of chromatin protein HMGB1 by necrotic cells triggers inflammation. *Nature*. 2002; 418: 191-195. doi: 10.1038/nature00858
- Schnabel D, Salas-Vidal E, Narvaez V, Sánchez-Carbente MdelR, Hernández-García D, Cuervo R, Covarrubias L.** Expression and regulation of antioxidant enzymes in the developing limb support a function of ROS in interdigital cell death. *Dev Biol*. 2006; 291: 291-299. doi: 10.1016/j.ybio.2005.12.023

- Schuettengruber B, Bourbon HM, Di Croce L, Cavalli G.** Genome Regulation by polycomb and trithorax: 70 years and counting. *Cell*. 2017; 171: 34-57. doi: 10.1016/j.cell.2017.08.002
- Schulz WA.** L1 retrotransposons in human cancers. *J Biomed Biotechnol*. 2006. 2006: 83672. doi: 10.1155/JBB/2006/83672
- Scully R y Xie A.** Double strand break repair functions of histone H2AX. *Mutat Res*. 2013; 750: 5-14. doi: 10.1016/j.mrfmmm.2013.07.007
- Serra-Juhé C, Cuscó I, Homs A, Flores R, Torán N, Pérez-Jurado LA.** DNA methylation abnormalities in congenital heart disease. *Epigenetics*. 2015; 10: 167-177. doi: 10.1080/15592294.2014.998536
- Shahid Z, Simpson B, Singh G.** Genetics, Histone code. *Genetics*. 2019. StatPearls Publishing: Treasure Island
- Sharif J, Endo TA, Nakayama M, Karimi MM, Shimada M, Katsuyama K, Goyal P, Brind'Amour J, Sun MA, Sun Z, Ishikura T, Mizutani-Koseki Y, Ohara O, Shinkai Y, Nakanishi M, Xie H, Lorincz MC, Koseki H.** Activation of endogenous retrovirus in Dnmt1-/- ESCs involves disruption of SETDB-Mediated repression by NP95 binding to hemi-methylated DNA. *Cell Stem Cell*. 2016; 19: 81-94. doi: 10.1016/j.stem.2016.03.013
- Sharma A, Singh K, Almasan A.** Histone H2AX phosphorylation: a marker for DNA damage. *Methods Mol Biol*. 2012; 920: 613-626. doi: 10.1007/978-1-61779-998-3_40
- Shen J, Wang C, Li D, Xu T, Myers J, Ashton JM, Wang T, Zuscik MJ, McAlinden A, O'Keefe RJ.** DNA methyltransferase 3b regulates articular cartilage homeostasis by altering metabolism. *JCI Insight*. 2017; 2: e93612. doi: 10.1172/jci.insight.93612
- Shiloh Y.** ATM and related protein kinases: safeguarding genome integrity. *Nat Rev Cancer*. 2003; 3: 155-168. doi:10.1038/nrc1011
- Singh BN, Zhang G, Hwa YL, Li J, Dowdy SC, Jiang SW.** Nonhistone protein acetylation as cancer therapy targets. *Expert Rev Anticancer Ther*. 2010; 10: 935-954. doi: 10.1586/era.10.62
- Smallwood A, Estève PO, Pradhan S, Carey M.** Functional cooperation between HP1 and DNMT1 mediates gene silencing. *Genes Dev*. 2007; 21: 1169-1178. doi: 10.1101/gad.1536807

- Solier S y Pommier Y.** MDC1 cleavage by caspase-3: a novel mechanism for inactivating the DNA damage response during apoptosis. *Cancer Res.* 2011; 71: 906-913. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-10-3297
- St Pierre R y Kadoch C.** Mammalian SWI/SNF complexes in cancer: emerging therapeutic opportunities. *Curr Opin Genet Dev.* 2017; 42: 56-67. doi: 10.1016/j.gde.2017.02.004
- Staines KA, Pollard AS, McGonnell IM, Farquharson C, Pitsillides AA.** Cartilage to bone transitions in health and disease. *J Endocrinol.* 2013; 219: 1–12. doi: 10.1530/JOE-13-0276
- Storer M, Mas A, Robert-Moreno A, pecoraro M, Ortelis MC, Di Giacomo V, Yosef R, Pilpel N, Krizhanovsky V, Sharpe J, Keyes WM.** Senescence is a developmental mechanism that contributes to embryonic growth and patterning. *Cell.* 2013; 155: 1119-1130. doi: 10.1016/j.cell.2013.10.041
- Strasser A, Jost PJ, Nagata S.** The many roles of FAS receptor signaling in the immune system. *Immunity.* 2009; 30: 180–192. doi: 10.1016/j.immuni.2009.01.001
- Strick R y Laemmli UK.** SARs are cis DNA elements of chromosome dynamics: synthesis of a SAR repressor protein. *Cell.* 1995; 83: 1137-1148. doi: 10.1016/0092-8674(95)90140-x
- Su TT.** Cellular responses to DNA damage: one signal, multiple choices. *Annu Rev Genet.* 2006; 40: 187-208. doi: 10.1146/annurev.genet.40.110405.090428
- Suda N, Itho T, Nakato R, Shirakawa D, Bando M, Katou Y, Kataoka K, Shirahide K, tickle C, Tanaka M.** Dimeric combinations of MafB, cFos and cJun control the apoptosis-survival balance in limb morphogenesis. *Development.* 2014; 141: 2885-2894. doi: 10.1242/dev.099150
- Sueyoshi T, Yamamoto K, Akiyama H.** Conditional deletion of Tgfb2 in hypertrophic chondrocytes delays terminal chondrocyte differentiation. *Matrix Biol.* 2012; 31: 352-359. doi: 10.1016/j.matbio.2012.07.002
- Sutherland BM, Bennet PV, Gerorgakilas AG, Sutherland JC.** Evaluation of number average length analysis in quantifying double strand breaks in genomic DNAs. *Biochem.* 2003; 42: 3375-3384. doi: 10.1021/bi0205505

- Svandova EB, Vesela B, Lesot H, Poliard A, Matalova E.** Expression of Fas, FasL, caspase-8 and other factors of the extrinsic apoptotic pathway during the onset of interdigital tissue elimination. *Histochem Cell Biol.* 2017; 147: 497-510. doi: 10.1007/s00418-016-1508-6
- Tan FJ, Zuckerman JF, Wells RC, Hill RB.** The C. elegans B-cell lymphoma 2 (Bcl-2) homolog cell death abnormal 9 (CED-9) associates with and remodels LIPID membranes. *Protein Sci.* 2011; 20: 62-74. doi: 10.1002/pro.536
- Tang J, Yang H, Zhuang S.** Histone deacetylases as targets for treatment of multiple diseases. *Clin Sci (London).* 2013; 124: 651-662. doi: 10.1042/CS20120504
- Tang Q, Chen Y, Wu W, Ding H, Xia Y, Chen D, Wang X.** Idiopathic male infertility and polymorphisms in the DNA methyltransferase genes involved in epigenetic marking. *Sci Rep.* 2017; 7: 11219. doi: 10.1038/s41598-017-11636-9
- Taniguchi N, Yoshida L, Ito T, Tsuda M, Mishima Y, Furumatsu T, Ronfani L, Abeyama K, Kawahara K, Komiya S, Maruyama I, Lotz M, Bianchi ME, Asahara H.** Stage-specific secretion of HMGB1 in cartilage regulates endochondral ossification. *Mol Cell Biol.* 2007; 27: 5650-5663. doi: 10.1128/MCB.00130-07
- Taverna SD, Coyne RS, Allis CD.** Methylation of histone H3 at lysine 9 targets programmed DNA elimination in *Tetrahymena*. *Cell.* 2002; 110: 701-711. doi: 10.1016/s0092-8674(02)00941-8
- Taylor SEB, Li YH, Smeriglio P, Rath M, Wong WH, Bhutani N.** Stable 5-hydroxymethylcytosine (5hmC) acquisition marks gene activation during chondrogenesis differentiation. *J Bone Miner Res.* 2016; 31: 524-534. doi: 10.1002/jbmr.2711
- Thomas JO y Travers AA.** HMG1 and 2, and related 'architectural' DNA-binding proteins. *Trends Biochem Sci.* 2001; 26: 167-174.
- Tittle RK, Sze R, Ng A, Nuckels RJ, Swartz ME, Anderson RM, Bosch J, Stainier DY, Eberhart JK, Gross JM.** Uhrf1 and Dnmt1 are required for development and maintenance of the zebrafish lens. *Dev Biol.* 2011; 350: 50-63. doi: 10.1016/j.ydbio.2010.11.009

- Toné S y Tanaka S.** Analysis of relationship between programmed cell death and cell cycle in limb-bud. *Horm Res.* 1997; 48: 5-10. doi:10.1159/000191293
- Torres IO y Fujimori DG.** Functional coupling between writers, erasers and readers of histone and DNA methylation. *Curr Opin Struct Biol.* 2015; 35: 68-75. doi: 10.1016/j.sbi.2015.09.007
- Trapp J y Jung M.** The role of NAD⁺ dependent histone deacetylases (sirtuins) in ageing. *Curr Drug Targets.* 2006; 7: 1553-1560.
- Tsai MC, Manor O, Wan Y, Mosammaparast N, Wang JK, Lan F, Shi Y, Segal E, Chang HY.** Long noncoding RNA as modular scaffold of histone modification complexes. *Science.* 2010; 329: 689–693. doi: 10.1126/science.1192002
- Tsuda M, Takahashi S, Takahashi Y, Asahara H.** Transcriptional co-activators CREB-binding protein and p300 regulate chondrocyte-specific gene expression via association with Sox9. *J Biol Chem.* 2003; 278: 27224-27229. doi: 10.1074/jbc.M303471200
- Ueda T, Postnikov YV, Bustin M.** Distinct domains in high mobility group N variants modulate specific chromatin modifications. *J Biol Chem.* 2006; 281: 10182-10187. doi:10.1074/jbc.M600821200
- Uusküla-Reimand L, Hou H, Samavarchi-Tehrani P, Rudan MV, Liang M, Medina-Rivera A, Mohammed H, Schmidt D, Schwalie P, Young EJ, Reimand J, Hadjur S, Gingras Ac, Wilson MD.** Topoisomerase II beta interacts with cohesion and CTCF at topological domain borders. *Genome Biol.* 2016; 17:182. doi: 10.1186/s13059-016-1043-8
- Valinluck V, Tsai HH, Rogstad DK, Burdzy A, Bird A, Sowers LC.** Oxidative damage to methyl-CpG sequences inhibits of the methyl-CpG binding domain (MBD) of methyl-CpG binding protein 2 (MeCP2). *Nucleic Acids Res.* 2004; 32: 4100-4108. doi: 10.1093/nar/gkh739
- van Kleffens M, Groffen C, van Neck JW, Vermeij-Keers C, Drop SLS.** mRNA and protein localization of the IGF system during mouse embryonic development in areas with apoptosis. *Growth Hormone & IGF Research.* 1999; 9: 195-204. doi: 10.1054/ghir.1999.0108

- van Meurs JB, Boer CG, Lopez-Delgado L, Riancho JA.** Role of epigenetics in bone and cartilage disease. *J Bone Miner Res.* 2019; 34: 215-230. doi: 10.1002/jbmr.3662
- Vaughan RM, Dickson BM, Cornett EM, Harrison JS, Kuhlman B, Rothbart SB.** Comparative biochemical analysis of UHRF proteins reveals molecular mechanisms that uncouple UHRF2 from DNA methylation maintenance. *Nucleic Acids Res.* 2018; 46: 4405-4416. doi: 10.1093/nar/gky151
- Vega RB, Matsuda K, Oh J, Barbosa AC, Yang X, Meadows E, McAnally J, Pomajzl C, Shelton JM, Richardson JA, Karsenty G, Olson EN.** Histone deacetylase 4 controls chondrocyte hypertrophy during skeletogenesis. *Cell.* 2004; 119: 555-566. doi: 10.1016/j.cell.2004.10.024
- Venturelli S, Sinnberg TW, Berger A, Noor S, Levesque MP, Böcker A, Niessner H, Lauer UM, Bitzer M, Garbe C, Busch C.** Epigenetic impacts of ascorbe on human metastatic melanoma cells. *Front Oncol.* 2014; 4: 227. doi: 10.3389/fonc.2014.00227
- Vernimmen D y Bickmore WA.** The hierarchy of transcriptional activation: from enhancer to promoter. *Trends Genet.* 2015; 31: 696-708. doi: 10.1016/j.tig.2015.10.004
- Villacorte M, Suzuki K, Hayashi K, De sousa lopes SC., Haraguchi R, Taketo MM, Nakagata N, Yamada G.** Antagonistic crosstalk of Wnt/beta-catenin/Bmp signaling within the Apical Ectodermal Ridge (AER) regulates interdigit formation. *Biochem Biophys Res Commun.* 2010; 391: 1653-1657. doi: 10.1016/j.bbrc.2009.12.109
- Voigt P, LeRoy G, Drury III WJ, Zee BM, Son J, Beck DB, Young NL, Garcia Ba, Reinberg D.** Asymmetrically modified nucleosomes. *Cell.* 2012; 151: 181–193. doi: 10.1016/j.cell.2012.09.002
- Volkmar M, Dedeurwaerder S, Cunha DA, Ndlovu MN, Defrance M, Deplus R, Calonne E, Volkmar U, Igoillo-Esteve M, Naamane N, Del Guerra S, Masini M, Bugliani M, Marchetti P, Cnop M, Eizirik DL, Fuks F.** DNA methylation profiling identifies epigenetic dysregulation in pancreatic islets from type 2 diabetes patients. *EMBO J.* 2012; 31: 1405-1426. doi: 10.1038/emboj.2011.503

- Volpe TA, Kidner C, Hall IM, Teng G, Grewal SI, Martienssen RA.** Regulation of heterochromatic silencing and histone H3 lysine 9 methylation by RNAi. *Science*. 2002; 297: 1833-1837. doi: 10.1126/science.1074973
- Waddington CH.** The epigenotype. *Endeavour*. 1942; 1: 18-20.
- Wahlin KJ, Enke RA, Fuller JA, Kalesnykas G, Zack DJ, Merbs SL.** Epigenetics and cell death: DNA hypermethylation in programmed retinal cell death. *PLoS One*. 2013; 8: e79140. doi: 10.1371/journal.pone.0079140
- Walczak H.** Death receptor–ligand systems in cancer, cell death, and inflammation. *Cold Spring Harb Perspect. Biol.* 2013. 5: a008698. doi: 10.1101/cshperspect.a008698
- Wang C, Abu-Amer Y, O’Keefe RJ, Shen J.** Loss of Dnmt3b in chondrocytes leads to delayed endochondral ossification and fracture repair. *J Bone Miner Res*. 2018; 33: 283-297. doi: 10.1002/jbmr.3305
- Wang C, Wang L, Ding Y, Lu X, Zhang G, Yang J, Zheng H, Wang H, Jiang Y, Xu L.** LncRNA structural characteristics in epigenetic regulation. *Int J Mol Sci*. 2017; 18: 2659. doi: 10.3390/ijms18122659
- Wang KC, Yang YW, Liu B, Sanval A, Corces-Zimmerman R, Chen Y, Lajoie BR, Protacio A, Flynn RA, Gupta RA, Wysocka J, Lei M, Dekker J, Helms JA, Chang HY.** Long noncoding RNA programs active chromatin domain to coordinate homeotic gene activation. *Nature*. 2011; 472: 120-124. doi: 10.1038/nature09819
- Wang W, Rigueur D, Lyons KM.** TGF β signaling in cartilage development and maintenance. *Birth Defects Res C Embryo Today*. 2014; 102: 37–51. doi: 10.1002/bdrc.21058
- Weatherbee SC, Behringer RR, Rasweiler JJ 4th, Niswander LA.** Interdigital webbing retention in bat wings illustrates genetic changes underlying amniote limb diversification. *PNAS*. 2006; 103: 15103-15107. doi: 10.1073/pnas.0604934103
- Wei WJ, Huang K, Tang C, Kang CS.** Non-coding RNAs as regulators in epigenetics (Review). *Oncol Rep*. 2017; 37: 3-9. doi: 10.3892/or.2016.5236
- West SC.** Molecular views of recombination proteins and their control. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2003; 4: 435-445. doi: 10.1038/nrm1127

- Westerndorf JJ, Zaidi SK, Cascino JE, Kahler R, van Wijnen AJ, Lian JB, Yoshida M, Stein GS, Li X.** Runx2 (Cbfa1, AML-3) interacts with histone deacetylase 6 and represses the p21 (CIP1/WAF1) promoter. *Mol Cell Biol.* 2002; 22: 7982-7992. doi: 10.1128/mcb.22.22.7982-7992.2002
- Wu BK, Mei SC, Brenner C.** RFTS-deleted DNMT1 enhances tumorigenicity with focal hypermethylation and global hypomethylation. *Cell Cycle.* 2014; 13: 3222-3231. doi: 10.4161/15384101.2014.950886
- Wu M, Chen G, Li YP.** TGF- β and BMP signaling in osteoblast, skeletal development, and bone formation, homeostasis and disease. *Bone Res.* 2016; 4: 16009. doi: 10.1038/boneres.2016.9
- Xie S, Wang Z, Okano M, Nogami M, Li Y, He WW, Okumura K, Li E.** Cloning, expression and chromosome locations of human DNMT3 gene family. *Gene.* 1999; 236: 87-95. doi: 10.1016/s0378-1119(99)00252-8
- Xu T, Wang C, Shen J, Tong P, O'Keefe R.** Ablation of Dnmt3b in chondrocytes suppresses cell maturation during embryonic development. *J Cell Biochem.* 2018; 119: 5852-5863. doi: 10.1002/jcb.26775
- Xu W, Jing L, Wang Q, Lin CC, Chen X, Diao J, Liu Y, Sun X.** Bas-PGAM5L-Drp1 complex is required for intrinsic apoptosis execution. *Oncotarget.* 2015; 6: 30017–30034. doi: 10.18632/oncotarget.5013
- Xue B, Zhao J, Feng P, Xing J, Wu H, Li Y.** Epigenetic mechanism and target therapy of UHRF1 protein complex in malignancies. *OncoTargets and Therapy.* 2019; 12: 549-559. doi: 10.2147/OTT.S192234
- Yamashita M, Inoue K, Saeki N, Ideta-Otsuka M, Tanagihara Y, Sawada Y, Sakakibara I, Lee J, Ichikawa K, Kamei Y, Limura T, Igarashi K, Takada Y, Imai Y.** Uhrf1 is indispensable for normal limb growth by regulating chondrocyte differentiation through specific gene expression. *Development.* 2018; 145. pii:dev157412. doi: 10.1242/dev.157412
- Yang C, Wang Y, Zhang F, Sun G, Li C, Jing S, Liu Q, Cheng Y.** Inhibiting UHRF1 expression enhances radiosensitivity in human esophageal squamous cell carcinoma. *Mol Biol Rep.* 2013; 40: 5225-5235. doi: 10.1007/s11033-013-2559-6

- Yang L, Lawson KA, Teteak CJ, Zou J, Hacquebord J, Patterson D, Ghatan AC, Mei Q, Zielinska-Kwiatkowska A, Bain SD, Fernandes RJ, Chansky HA.** ESET histone methyltransferase is essential to hypertrophic differentiation of growth plate chondrocytes and formation of epiphyseal plates. *Dev Biol.* 2013; 380: 99-110. doi: 10.1016/j.ydbio.2013.04.031
- Yang YW, Tan YY, Wong R, Wenden A, Zhang LK, Rabie AB.** The role of vascular endothelial growth factor in ossification. *Int J Oral Sci.* 2012; 4: 64–68. doi: 10.1038/ijos.2012.33.
- Yapp C, Carr AJ, Price A, Oppermann U, Snelling SJ.** H3K27me3 demethylases regulate in vitro chondrogenesis and chondrocyte activity in osteoarthritis. *Arthritis Res Ther.* 2016; 18: 158. doi: 10.1186/s13075-016-1053-7
- Zaman S, Wang R, Gandhi V.** Targeting the apoptosis pathway in hematologic malignancies. *Leuk Lymphoma.* 2014; 55: 1980–1992. doi: 10.3109/10428194.2013.855307
- Zamudio NM, Scott HS, Wolski K, Lo CY, Law C, Leong D, Kinkel SA, Chong S, Jolley D, Smyth GK, de Kretser D, Whitelaw E, O'Bryan MK.** DNMT3L is a regulator of X chromosome compaction and post-meiotic gene transcription. *PLoS One.* 2011; 6: e18276. doi: 10.1371/journal.pone.0018276
- Zaret KS.** Cell fate conversion: a chromatin remodeling checkpoint revealed. *Cell Research.* 2017; 27: 598-599. doi: 10.1038/cr.2017.44
- Zeng L, Zhang W, Li S, Pltnikov AL, Walsh MJ, Zhou MM.** Mechanism and regulation of acetylated histone binding by the tandem PHD finger of DPF3b. *Nature.* 2010; 466: 258-262. doi: 10.1038/nature09139
- Zhang F, Xu L, Xu L, Xu Q, Li D, Yang Y, Karsenty G, Chen CD.** JMJD3 promotes chondrocyte proliferation and hypertrophy during endochondral bone formation in mice. *J Mol Cell Biol.* 2015; 7: 23-34. doi: 10.1093/jmcb/mjv003
- Zhang J, Gao Q, Li P, Liu X, Jia Y, Wu W, Li J, Dong S, Koseki H, Wong J.** S phase-dependent interaction with DNMT1 dictates the role of UHRF1 but not UHRF2 in DNA methylation maintenance. *Cell Res.* 2011; 21: 1723–1739. doi: 10.1038/cr.2011.176

- Zhang Q y Wang Y.** High mobility group proteins and their post-translational modifications. *Biochim Biophys Acta*. 2008; 1784: 1159-1166. doi: 10.1016/j.bbapap.2008.04.028
- Zhang R, Chen W, Adams PD.** Molecular dissection of formation of senescence-associated heterochromatin foci. *Mol Cell Biol*. 2007; 27: 2343-2358. doi: 10.1128/MCB.02019-06
- Zhang W y Xu J.** DNA methyltransferases and their roles in tumorigenesis. *Biomark Res*. 2017; 5:1 doi: 10.1186/s40364-017-0081-z
- Zhang X, Su J, Jeong M, Ko M, Huang Y, Park HJ, Guzman A, Lei Y, Huang YH, Rao A, Li W, Goodell MA.** DNMT3A and TET2 compete and cooperate to repress lineage-specific transcription factors in hematopoietic stem cells. *Nat. Genet*. 2016; 48: 1014–1023. doi: 10.1038/ng.3610
- Zhang Z, Kang Y, Zhang Z, Zhang H, Duan X, Liu J, Li X, Liao W.** Expression of microRNAs during chondrogenesis of human adipose-derived stem cells. *Osteoarthr Cartil*. 2012; 20: 1638-1646. doi: 10.1016/j.joca.2012.08.024
- Zhao K, Kas E, Gonzalez E, Laemmli UK.** SAR-dependent mobilization of histone H1 by HMG-I/ Y in vitro: HMG-I/Y is enriched in H1-depleted chromatin. *EMBO J*. 1993; 12: 3237-3247
- Zhao L, Jiang S, Hantash BM.** Transforming growth factor beta1 induces osteogenic differentiation of murine bone marrow stromal cells. *Tissue Eng Part A*. 2010; 16: 725-733. doi: 10.1089/ten.TEA.2009.0495
- Zhou J, Li P, Chen Q, Wei X, Zhao T, Wang Z, Wei L.** Mitogen-activated protein kinase p38 induces HDAC4 degradation in hypertrophic chondrocytes. *Biochim Biophys Acta*. 2015; 1853: 370-376. doi: 10.1016/j.bbamcr.2014.11.003
- Zhou K, Gaullier G, Luger K.** Nucleosome structure and dynamics are coming of age. *Nat Struct Mol Biol*. 2009; 26: 3-13. doi:10.1038/s41594-018-0166-x
- Zhou L, Zhao X, Han Y, Lu Y, Shang Y, Liu C, Li T, Jin Z, Fan D, Wu K.** Regulation of UHRF1 by miR-146a/b modulates gastric cancer invasion and metastasis. *FASEB J*. 2013; 27: 4929-4939. doi:10.1096/fj.13-233387
- Zhou T, Xiong J, Wang M, Yang N, Wong J, Zhu B, Xu RM.** Structural basis for hydroxymethylcytosine recognition by the SRA domain of UHRF2. *Mol Cell*. 2014; 54: 879-886. doi: 10.1016/j.molcel.2014.04.003

- Zimmermann P, Boeuf A, Dickhut A, Boehmer S, Olek S, Richter W.** Correlation of COL10A1 induction during chondrogenesis of mesenchymal stem cells with demethylation of two CpG sites in the COL10A1 promoter. *Arthritis Rheum.* 2008; 58: 2743-2753. doi: 10.1002/art.23736
- Zuscik MJ, Baden JF, Wu Q, Sheu TJ, Schwarz EM, Drissi H, O'Keefe RF, Puzas JE, Rosier RN.** 5-Azacytidine alters TGF-beta and BMP signaling and induces maturation in articular chondrocytes. *J Cell Biochem.* 2004; 92: 316-331. doi:10.1002/jcb.20050
- Zuzarte-Luis V, Montero JA, Kawakami Y, Izpisua-Belmonte JC, Hurle JM.** Lysosomal cathepsins in embryonic programmed cell death. *Dev Biol.* 2007; 301: 205–217. doi: 10.1016/j.ydbio.2006.08.008

9. ARTÍCULOS

SCIENTIFIC REPORTS

OPEN

DNA damage precedes apoptosis during the regression of the interdigital tissue in vertebrate embryos

Received: 02 June 2016
Accepted: 30 September 2016
Published: 18 October 2016

Juan A. Montero*, Cristina Sanchez-Fernandez*, Carlos I. Lorda-Diez, Juan A. Garcia-Porrero & Juan M. Hurlé

DNA damage independent of caspase activation accompanies programmed cell death in different vertebrate embryonic organs. We analyzed the significance of DNA damage during the regression of the interdigital tissue, which sculpts the digits in the embryonic limb. Interdigit remodeling involves oxidative stress, massive apoptosis and cell senescence. Phosphorylation of H2AX mediated by ATM precedes caspase dependent apoptosis and cell senescence during interdigit regression. The association of γ H2AX with other downstream DNA repair factors, including MDC1, Rad50 and 53BP1 suggests a defensive response of cells against DNA damage. The relative distribution of cells γ H2AX-only positive, TUNEL-only positive, and cells double positive for both markers is consistent with a sequence of degenerative events starting by damage of the DNA. In support of this interpretation, the relative number of γ H2AX-only cells increases after caspase inhibition while the relative number of TUNEL-only cells increases after inhibition of ATM. Furthermore, cultured interdigits survived and maintained intense chondrogenic potential, even at advanced stages of degeneration, discarding a previous commitment to die. Our findings support a new biological paradigm considering embryonic cell death secondary to genotoxic stimuli, challenging the idea that considers physiological cell death a cell suicide regulated by an internal death clock that pre-programmes degeneration.

Histological studies in the past century discovered that most morphogenetic events of the developing organ primordia were accompanied by massive cell death within a portion of their tissue components¹. Researchers at that time emphasized the contradictory nature of such a cell destruction processes in systems, such as the developing embryo, which requires intense and continuous growth. Similar degenerative phenomena were soon observed in tumor tissues that were also undergoing intense growth. Dying cells in those systems shared an uniform morphological appearance, which was termed apoptosis to distinguish that phenomenon from necrotic cell death that occurred secondary to insults and resulted in the rupture of cell integrity². It was proposed that apoptosis represented some kind of cell suicide to facilitate normal embryonic development or to prevent the spread of a localized lesion, allowing for the survival of the organism as a whole. Initial genetic investigations in *C. elegans*, which were later extended to insects and vertebrates, discovered an evolutionary conserved molecular cascade responsible for apoptosis (see review ref. 3). A family of proteases, termed caspases was identified as central players of apoptosis. However, except for the developing nervous system, mice deficient in caspases showed a poor correlation between their phenotypes and the organ morphology expected to result from the inhibition of cell death during the embryonic development⁴. In addition, we now know that caspases perform other functions in addition to cell death, including a role promoting regenerative proliferation (see refs 4 and 5).

A remarkable process of massive embryonic cell death occurs in the interdigital tissue during digit formation in the developing limb of vertebrates, and this process is rudimentary or absent in species with webbed digits (e.g., bat, duck, and some tortoises). The regression of the interdigital tissue involves massive apoptosis, growth arrest, senescence, and degradation of the extracellular matrix^{6,7}, and genetic, biochemical, and molecular studies have not yet provided a comprehensive explanation for this process of tissue remodeling. Initiator (caspase-2,

Departamento de Anatomía y Biología Celular and IDIVAL, Universidad de Cantabria, Santander 39011, Spain.
*These authors contributed equally to this work. Correspondence and requests for materials should be addressed to J.M.H. (email: hurlej@unican.es)

8, and 9) and executioner caspases (caspase-3, 6 and –7) in addition to pro-apoptotic factors of the intrinsic (mitochondrial) apoptotic pathway have been implicated in the regression of interdigital tissue⁸. However, syndactyly is observed only in compound mutants affecting more than one pro-apoptotic factor that is implicated in the permeabilization of the mitochondrial membrane; syndactyly is not observed in mice bearing single or compound caspase mutations, or in mice deficient in the caspase-activating adaptor protein, APAF-1 (reviewed by ref. 7). Similarly, while lysosomes also appear to be active players of interdigital cell death^{9,10}, mice deficient in cathepsins lack the syndactyly phenotype¹¹. In addition, the occurrence of an associated cell senescence process in the regression of interdigits is a striking feature that is difficult to explain¹². These findings have been largely interpreted as evidence for a functional redundancy between the biological mechanisms responsible for tissue degeneration, allowing each to replace the other should one pathway fail¹³.

The occurrence of proliferation arrest, cell senescence, and apoptosis is suggestive of a common upstream triggering factor. It has been hypothesized that DNA damage might be the primary step of cell death within stem cells which prevents the perpetuation of injured genomes¹⁴. Eucaryotic cells have evolved a complex DNA repair machinery that is quickly activated following DNA strand breaks. The DNA damage response (DDR) is destined to repair DNA but also results in cell cycle arrest, cell senescence, and apoptosis to ensure genomic stability^{15,16}. The aim of this study was to determine whether DNA damage precedes the degradative routes observed in the remodeling of interdigits termed the Interdigital Necrotic Zones (INZs).

Methods

We used Rhode Island chicken embryos from 5 to 8.5 days of incubation (id), which is equivalent to stages 25 to 34 HH, and C57BL6 mouse embryos from 12 to 14 days post-coitum (p.c.). The animal care and handling, and all the experimental procedures were in accordance with the guidelines of the European Communities Council and the Spanish legislation and they were approved by the Service of Animal Health and Welfare of the Regional Government of Cantabria (Reference no. PI-10-15). In all cases studies were done in the third interdigit of the avian leg bud, or the fourth interdigit of mouse samples.

Immunolabeling, TUNEL assay, and confocal microscopy. The expression of DNA repairing factors was studied by the immunolabeling of vibratome sections or in dissociated interdigital cells from chick embryos ranging from 5 to 8 id or mouse embryos between 13 to 14 days p.c. The use of mouse material allowed us to extend our findings in the avian model to mammals, and increased the availability of commercial antibodies. We employed the following antibodies: γ H2AX mouse monoclonal (JBW301, Milipore-Upstate) and rabbit polyclonal (A300-272A, NOVUS); Rad50 rabbit polyclonal (07-1781, Millipore); MDC1 rabbit polyclonal (ab41951 Abcam); 53BP1 rabbit polyclonal (A300-272A, Bethyl Lab., Inc); phospho-ATM mouse monoclonal (#4526, Cell Signaling); and active caspase 3 (a generous gift of Dr E. de la Rosa). In most cases, samples were used for double-labeling or for the combined detection of apoptosis by TUNEL assay. Counterstaining using fluorescent-phalloidin (Sigma) or DAPI (Vector Laboratories) was also performed.

For tissue sections, the autopods were fixed in 4% PFA, washed in PBS and sectioned at 100 μ m using a vibratome.

To obtain dissociated interdigital mesodermal cells, small squares of the third interdigit from limbs fixed in PFA were dissected free and carefully flattened with a coverslide. The slides were then deep frozen over dry ice to adhere the cells to the glass surface. Cells were permeabilized with 0.5% Triton X-100 (60 min) before incubation with the primary antibody, and after several PBS washes, the cells were incubated with the secondary antibody.

Experimental manipulation of interdigit regression. Treatments to promote or inhibit interdigit regression were made by the local implantation of heparin acrylic (H5263, Sigma), Affi-Gel Blue beads (BioRad), or anion exchange resin beads (AG1X-2, BioRad; 150 μ m in diameter) incubated for one hour in the selected reagents (see ref. 17 for details). Observations were based on the analysis of at least 5 experimental limbs for each treatment and stage.

Interdigital cell death was induced by implanting into chick limbs at id 5 or 5.5 heparin beads (Sigma) incubated in 10 μ g/ml of BMP2 (Preprotech) or in the BMP2 analogous compound AB204 (a generous gift of Senyon Choe). In these specimens, we analyzed changes in cell death, DDR markers, and cell senescence. To specifically determine the importance of the DDR in the degenerative process induced by BMP-containing beads, we also performed double treatments with a BMP bead and an anion exchange resin bead incubated with inhibitors of kinases responsible for triggering DDR. For this purpose, we employed KU-60019 (UBPbio) to inhibit ATM (Ataxia Telangiectasia Mutated), VE-821 (UBPbio) to inhibit ATR (Ataxia Telangiectasia Rad3 related) and NU7026 (Selleckchem) to inhibit DNA-PKcs (the catalytic subunit of DNA-dependent protein kinase).

The effect of increased oxidative stress was analyzed by the interdigital implantation of air dried Affi-Gel Blue beads hydrated in H₂O₂. After assaying different concentrations, we selected concentrations of 70 or 100 mM H₂O₂, which efficiently induced a moderate increase in cell death.

The effects of inhibiting caspases were analyzed by implanting heparin beads incubated with the pan-caspase inhibitor Q-VD-OPh (TNB-1002 TONBO Biosciences). In all cases, the contralateral untreated limb or limbs treated with a PBS-bead were used as controls.

Treatments with empty beads were employed as controls in all experiments. The absence of effects on interdigit regression of these treatments is illustrated in Supplementary Figure 1.

Cell senescence and neutral red vital staining. Cell senescence was evaluated by detecting β -galactosidase activity at pH 6 in vibratome sections of limb autopods fixed in 4% glutaraldehyde as previous described in ref. 12.

For vital staining, the autopods were dissected free and immersed in 0.01% neutral red diluted in PBS at 37°C for 15 to 30 min until positive staining in the areas of cell death was obtained.

Interdigit explants culture. The third interdigit of chick embryos was dissected free from the leg buds at id 5.5 to 7.5 and cultured for 48 or 72 hr in DMEM (GIBCO) with 10% fetal bovine serum (GIBCO), 100 units/ml penicillin and 100 µg/ml streptomycin. Explants were fixed in 5% trichloroacetic acid and stained with alcian blue to detect chondrogenesis. The specimens were then embedded in araldite or paraffin wax. Tissue sections were obtained and stained with toluidine blue or hematoxylin and eosin.

Cell nucleofection. The morphological evolution of interdigital cells positive for γ H2AX was analyzed in cultures of dissociated interdigit mesoderm. For this purpose, cells were transfected with a construct encoding the human *Btg2* gene cloned into the pCMV6-XL5 vector (SC115914, Origene). The efficiency of electroporation was confirmed using qPCR and immunohistochemistry. After two days of culture, cells were fixed in PFA and labeled with anti- γ H2AX in combination with rhodamin-phalloidin. The samples were examined using a confocal microscope to correlate changes in the distribution of the actin cytoskeleton with the intensity of γ H2AX immunolabeling.

Confocal microscopy. Samples were examined with a laser confocal microscope (LZEISS LSM 510) using a Plan-Neofluar 10 \times , 20 \times or Plan-Apochromat 63 \times objectives, an argon ion laser (488 nm) to excite FITC fluorescence and a HeNe laser (543 nm) to excite Texas Red. Limb specimens were optically sectioned, and we used the LSM 5 Image Examiner software on a Windows NT-Based PC for stack digitalization in the different experiments.

Statistics. Cells positive for the different markers of cell death and DDR were counted from photographs of histological specimens taken at the same magnification. Each value represents the mean \pm SEM of the percentage of cells positive for the different markers obtained from at least five independent samples from each stage or experimental group. Data were analyzed using Student's *t* tests or ANOVAs followed by Bonferroni tests for post-hoc comparisons. Statistical significance was set at $p < 0.05$.

Results

γ H2AX-positive DNA damage is a precocious event of interdigital cell death. The initial response of most eucaryotic cells to repair DNA damage is the phosphorylation at the break region of substrates, such as the histone variant H2AX that forms γ H2AX (H2AXS139PO₄; ref. 18) that facilitates the recruitment of additional DDR mediators. Therefore, we analyzed the extent and potential significance of DNA damage in the regressing interdigit by comparing the γ H2AX expression pattern with conventional markers of interdigital cell death and tissue regression.

γ H2AX immunolabeling appeared as a precise and precocious marker of INZ detectable beginning at 6 id, a time when neutral red vital staining and β -gal labeling for cell death and senescence remain negative (Fig. 1A–C). In subsequent stages (Fig. 1D–F), γ H2AX labeling was largely coincident with both neutral red and β -gal, but with more extensive distribution in the interdigit.

The combined detection of TUNEL and γ H2AX revealed three types of degenerating cells in the regressing interdigits: i) cells positive for γ H2AX only; ii) cells TUNEL-positive only; and, iii) cells double-positive for γ H2AX and TUNEL (Fig. 2A–D). The percentage of cells that were γ H2AX-only and TUNEL-only-positive changed over the course of interdigit regression. As shown in Fig. 2E, we found significant differences between the numbers of each type of degenerating cell over the course of interdigit remodeling. At id 6 and 6.5, γ H2AX-only-positive cells were predominant (57% and 56%, respectively) and TUNEL-only positive were scarce (21% and 18%, respectively). At id 7, the numbers of γ H2AX-only- and TUNEL-only-positive cells were similar. In contrast, at id 7.5, TUNEL-only-positive cells were predominant (58%), while γ H2AX-only-positive cells were very scarce (15%). The relative intensity of these two markers in the degenerating cells was also suggestive of a sequence of events. Hence, punctate γ H2AX labeling of DNA damage was observed mostly during early stages of interdigit remodeling. In the course of remodeling diffuse pan-nuclear labeling were predominant. These cells were positive for TUNEL in the rate mentioned above. Remarkably, γ H2AX labeling in these double positive cells, becomes very intense and compacted, paralleling the pycnotic appearance of TUNEL staining (Fig. 2A–D).

Together, these findings are consistent with a sequence of cell degeneration initiated by DNA damage that involves DNA repair through γ H2AX, followed by apoptotic DNA fragmentation and/or cell senescence. In fact, the pattern of pan-nuclear γ H2AX labeling is characteristic of cells experiencing replication stress, a feature which precedes cell senescence. Based on this interpretation, TUNEL-only-positive cells might represent a cell population in which the intensity of initial DNA damage, caused by direct DNA breakage or associated with replication stress, precludes the DNA repair response.

To discard that DNA damage was a singular feature of INZ, we analyzed programmed cell death in other areas of the limb (the so-called posterior necrotic zone, PNZ, and the thickened ectoderm of the distal margin of the limb, termed Apical Ectodermal Ridge, AER), and also in other developing organs, such as the heart, where cell death occurs both in mesenchymal cells of the developing septa and valves and also in the muscle of the outflow tract^{19,20}. Supplementary Figure 2, illustrates the presence of both TUNEL-positive, senescent and γ H2AX-positive cells, indicating that the coexistence of these three types of degenerating cells is a general feature of embryonic cell death regardless the type of tissue (epithelium, mesenchyme or muscle).

Sequence of cell degeneration. To further confirm that DNA damage is an initial step in the degenerative process responsible for interdigit removal, we monitored alterations in the actin cytoskeleton within limb mesodermal cultures transfected with *Btg2*. We have previously shown that the actin cytoskeleton is a precise marker of cell degeneration²¹. In addition, BTG2 is a tumor suppressor factor expressed in the interdigits, and its forced

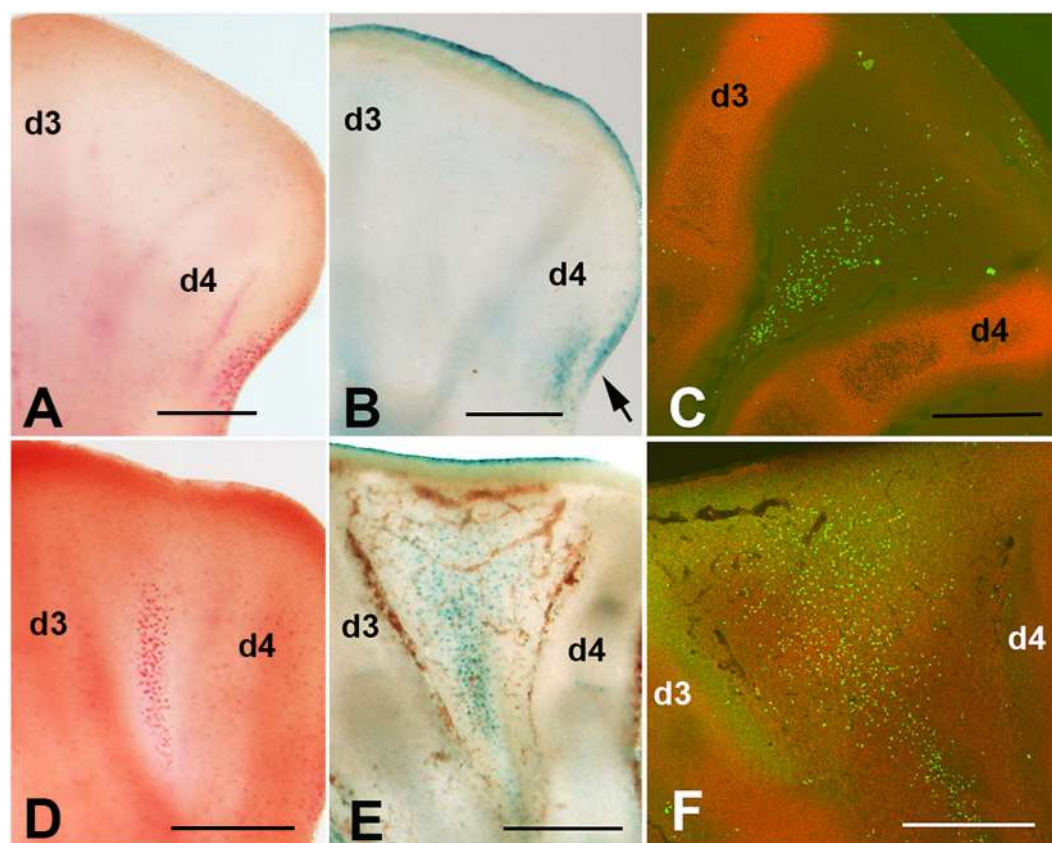


Figure 1. Sequence of interdigit regression in the chick leg bud following neutral red vital staining (A,D); β -gal assay for cell senescence (B,E); and γ H2AX immunolabeling (C,F). (A–C) Show autopods at id 6, indicating that, at this stage, only γ H2AX immunolabeling (C) shows evidence of initial degeneration. (D–F) Show autopods at id 7 and demonstrate that the positivity of the third interdigit for neutral red (D) and β -gal labeling (E) is relatively less intense than the distribution of γ H2AX-positive cells (F). Arrow indicate the posterior necrotic zone (PNZ) in (B). In all pictures, digit 3 (d3) and digit 4 (d4) are indicated to establish the limits of the third interdigit. In (C), γ H2AX immunolabeling is combined with SOX9 which marks the digit cartilage. Bars = 200 μ m.

expression in limb mesodermal progenitors induces the accumulation of reactive oxygen species (ROS), cell death, and senescence¹². As expected, the number of cells positive for γ H2AX increased significantly in cultures overexpressing *Btg2* (Supplementary Figure 3). Although, our observations would require further corroboration by living imaging procedures, a detailed examination of the actin cytoskeleton allowed us to establish a tentative sequence of degeneration based on the intensity of γ H2AX positivity and the level of disintegration of the actin cytoskeleton (Fig. 2F–I). Cells with moderate levels of γ H2AX-positive foci maintained their characteristic stellated appearance with a peripheral distribution of actin bundles (Fig. 2F). More intense levels of γ H2AX positivity were associated with a reduction or loss of cell prolongations that were accompanied by occasional deposition of fine clumps of actin-positive material (Fig. 2G). Intensification and predominant pan-nuclear distribution of γ H2AX labeling was accompanied by cell rounding, loss of peripheral actin fibers, and dramatic intracytoplasmic precipitation of actin-positive material (Fig. 2H). In the final stages of degeneration, the nuclei appear pyknotic, and cells lost contact with their neighbours being detached into the culture medium (Fig. 2I).

The activation of the DNA damage repair response in interdigital cells undergoing cell death.

The data described above suggest that precocious DNA damage precedes apoptosis in regressing interdigits. Apoptotic DNA breaks might trigger the initial phosphorylation stages of DDR; however, several DDR mediators are cleaved by caspases, which precludes their activation in apoptotic cell death²². Therefore, we asked whether the phosphorylation of H2AX is accompanied by the activation of other DNA repair factors. To investigate this, we analyzed by immunohistochemistry the presence of a panel of DNA repair factors in the interdigit mesoderm over the course of remodeling (Fig. 3).

γ H2AX-positive cells were also labeled with anti-phospho-ATM (Fig. 3E). Positivity was also observed for the mediator of DNA damage checkpoint protein 1 (MDC1) (Fig. 3A). MDC1 is a target of caspases²² and it is an important DNA repair factor that regulates cell cycle checkpoints and recruits repair proteins to the DNA. In addition, Rad50 (Fig. 3B), which marks the initiation of DNA repair, and 53BP1 (Fig. 3C), which is a chromatin-binding factor downstream of γ H2AX and MDC1 in the DDR cascade, were also activated in the interdigital cells that were positive for γ H2AX. Consistent with the occurrence of a sequence of degenerative

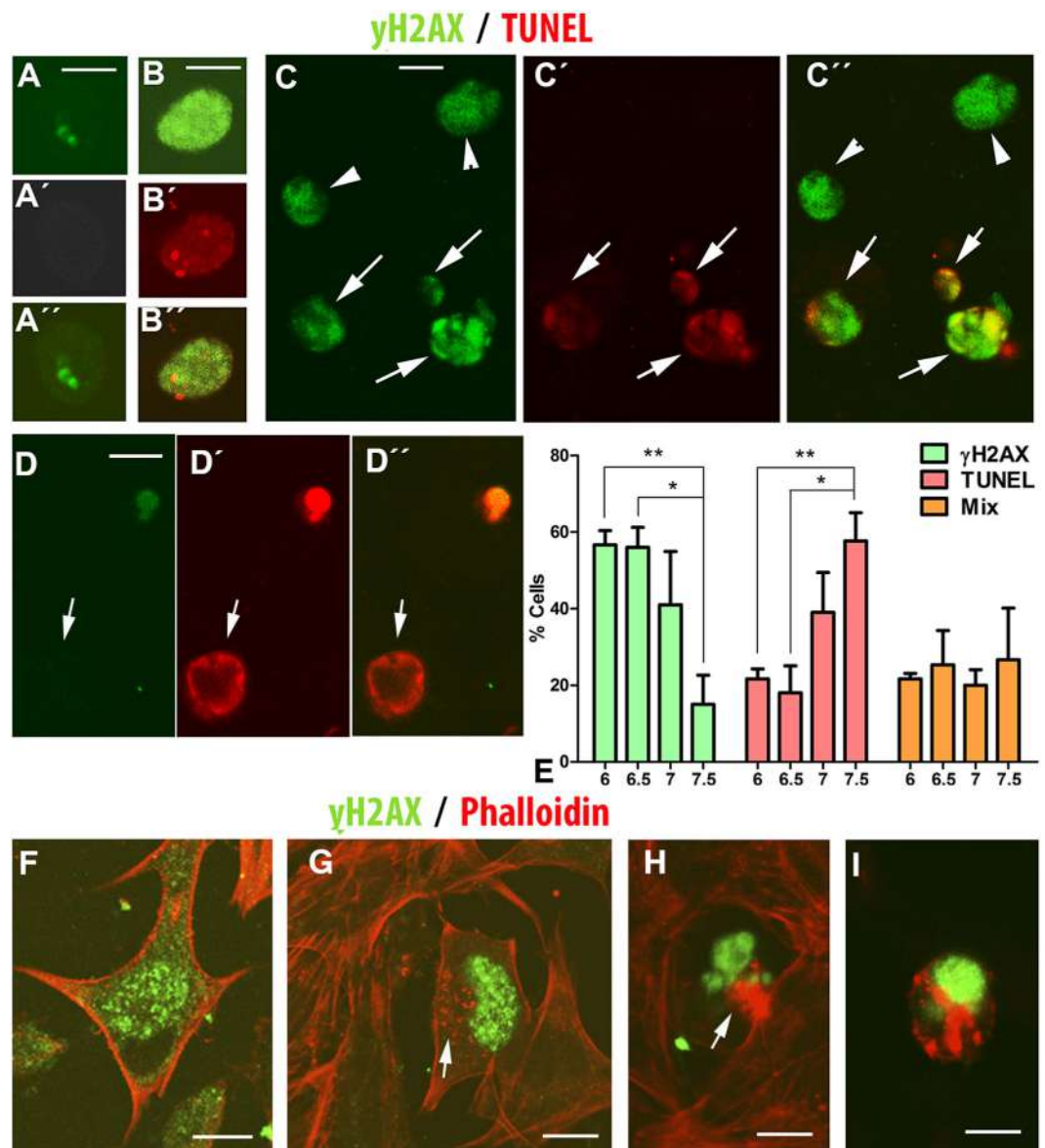


Figure 2. (A–D) Detailed views of chick interdigital cells, isolated from the third interdigit at id 6.5 and 7, showing different levels of positivity for γ H2AX immunolabeling (green) and TUNEL (red). (A) Cells at the initial stages of γ H2AX positivity are TUNEL-negative. A, shows γ H2AX immunolabeling; A' shows TUNEL labeling; and A'', shows a merge image. (B) γ H2AX positive cell at the initial stages of TUNEL positivity. B, shows γ H2AX positive cell; B' shows TUNEL positivity; and B'', shows the merge image. (C) A small group of interdigital γ H2AX-positive cells that include cells H2AX-only-positive cells (arrow heads) and cells double-positive for γ H2AX and TUNEL (arrows). C', shows TUNEL labeling; and C'', shows the merged image. D–D'', γ H2AX negative and TUNEL positive cell at id 7 (arrow). (D) Shows γ H2AX labeling; D' shows TUNEL labeling; and D'', shows the merged image. (E) Graphic representation of the percentage of cells that were γ H2AX-only-positive (green columns); TUNEL-only-positive (red); and γ H2AX-TUNEL double-positive (orange) in the third interdigit of chick limbs at id, 6, 6.5, 7, and 7.5. ** $p < 0.01$; * $p < 0.05$. (F–I) Interdigital mesodermal cells transfected with hBtg2 gene were cultured for 48 hr and labeled with γ H2AX (green) and phalloidin (red) to illustrate the sequence of cell degeneration by correlating the intensity of γ H2AX immunolabeling and the disintegration of the actin cytoskeleton. (F) Shows the conserved stellated morphology of a cell with mild γ H2AX immunolabeling. (G) Shows a more advanced level of γ H2AX labeling that correlates with a loss of cytoplasmic prolongations and a moderate accumulation of actin filaments in the cytoplasm (arrow). (H) Shows a cell with very advanced γ H2AX positivity which correlates with massive accumulation of actin in a large cytoplasmic clump (arrow). (I) Shows a degenerating cell in the course of detaching from the culture. The cell shape is now rounded and the intense γ H2AX labeling correlates with an increased deposition of degenerated actin microfilaments. Bars = 5 μ m.

events, the mentioned factors often co-localize with γ H2AX (Fig. 3) at the beginning of the degenerative process, but co-localization foci are scarce at advanced stages of interdigit remodeling.

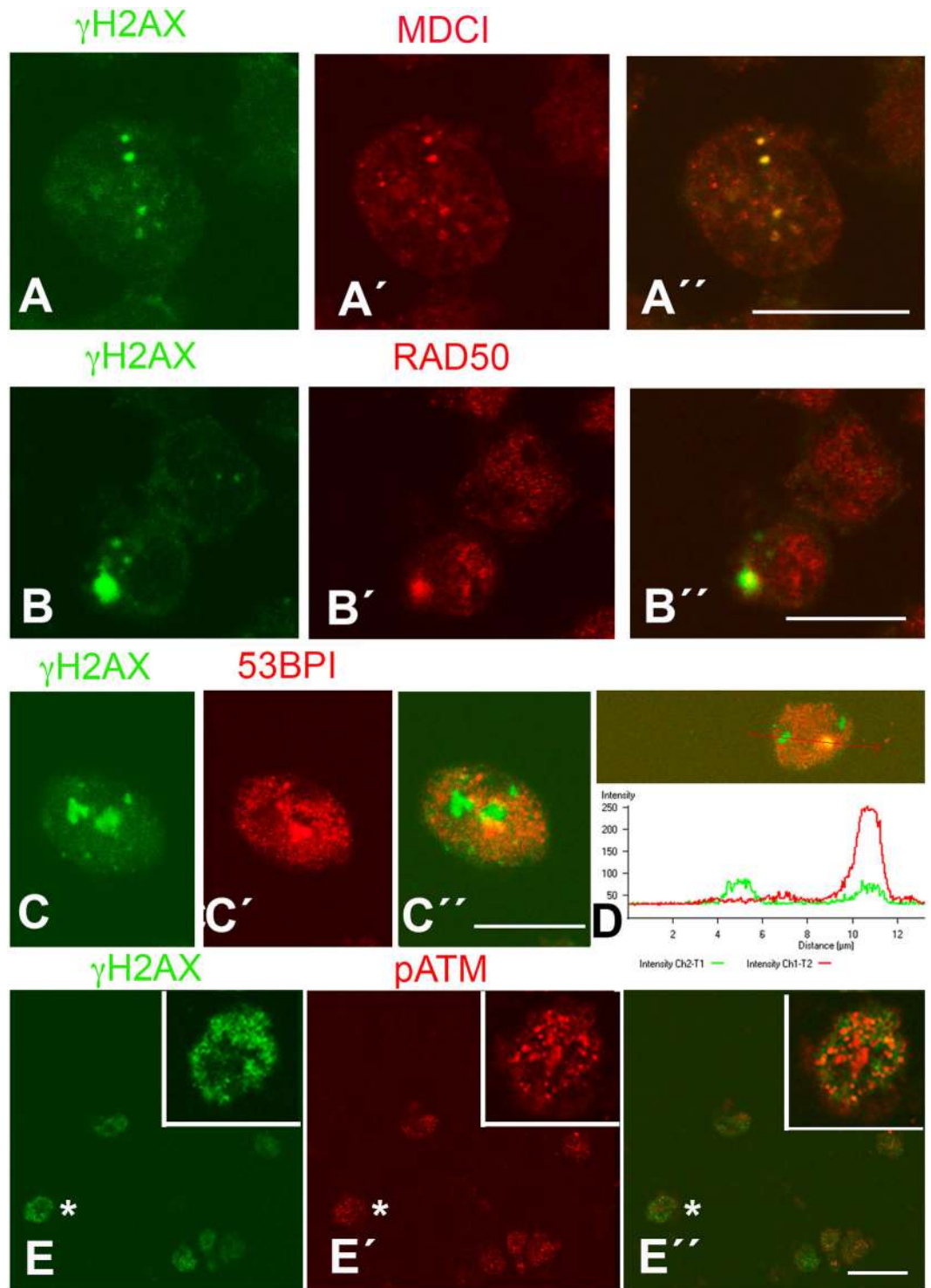


Figure 3. Mouse interdigital cells at day 13.5 pc immunolabeled for γ H2AX (A–C) in combination with MDC1 (A'), RAD50 (B') and 53BP1 (C') to show the activation of DDR mediators prior to overt cell degeneration. A'', B'', and C'' are merged images. (D) Pixel intensity plot of the region indicated by red arrow showing the labeling distribution of 53BP1 (red) and γ H2AX (green) in an interdigital cell similar to that shown in (C). Note the presence of isolated γ H2AX foci and a region of colocalization with 53BP1. (E) Chick interdigital cells at id 6 immunolabeled for γ H2AX (E) and pATM (E'). E'' is the merged image. Inset is a detailed view of the cell indicated by asterisk. Bars in (A–C) = 10 μ m; bar in (E) = 30 μ m.

Together, these observations support the hypothesis that interdigit remodeling is initiated by non-apoptotic DNA damage.

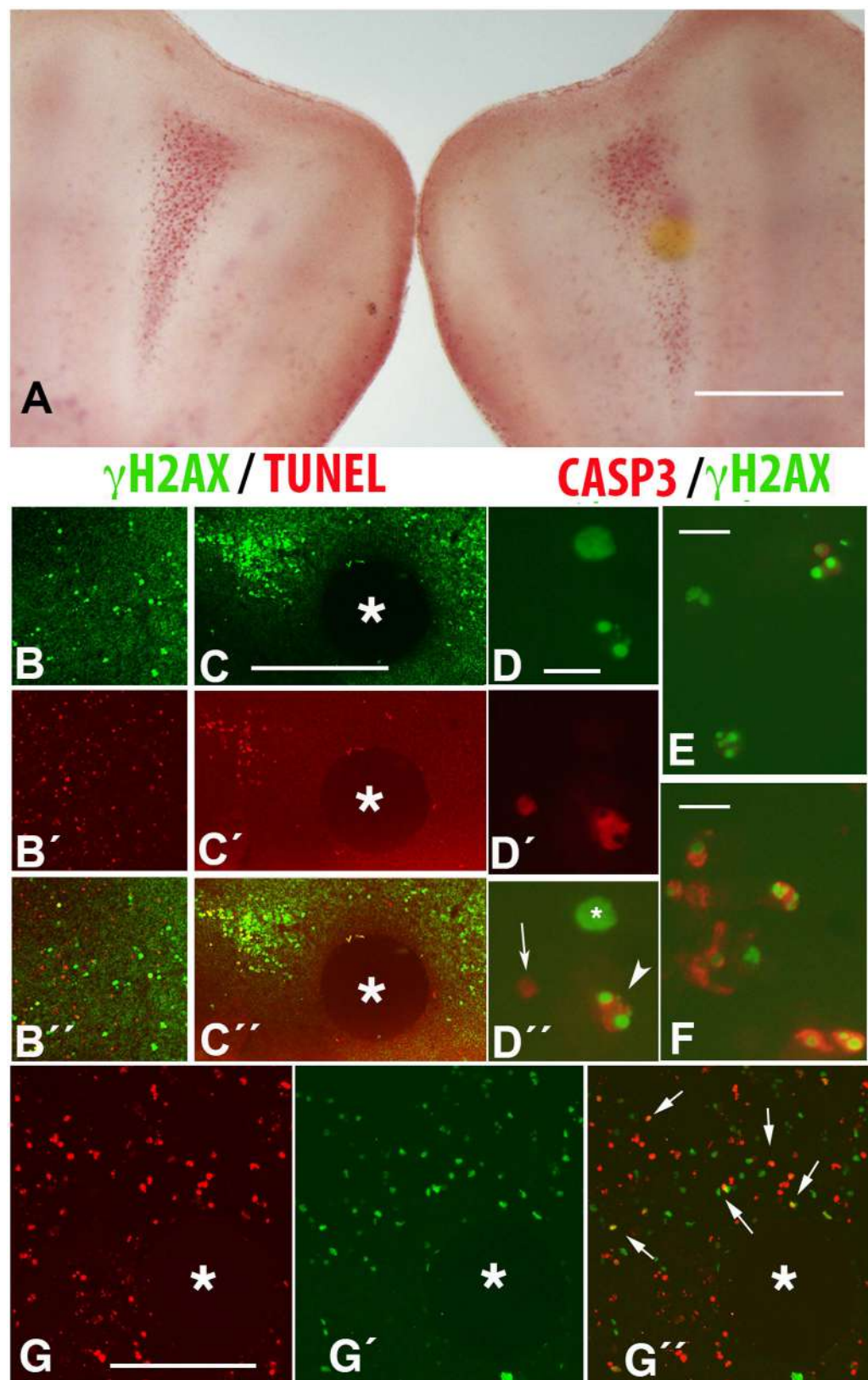


Figure 4. (A) Control (left) and experimental (right) autopods 24 hr after the interdigital implantation of a bead incubated with the pan-caspase inhibitor and following vital staining with neutral red. Note the moderate diminution of cell death around the bead. Bar = 200 μm. (B,C) Are confocal images of control (B) and experimental (C) interdigits 24 hr after the interdigital implantation of a bead (*) bearing the pan-caspase inhibitor. Note the reduction in TUNEL-positive cells (C'; red labeling) in comparison with the contralateral, control interdigit (B'). Note also the major abundance of cells γH2AX-positive in the experimental interdigit

(C, green labeling) in comparison with the control (B). B'' and C'' are the merged images of B-B' and C-C'. Bar for (B,C) = 100 μ m. D-D'' Squash of the interdigital mesoderm at id 7.5 after immunolabeling with anti- γ H2AX (green in D and D'') and active caspase 3 (red in D' and D''), to show that cells positive for γ H2AX can be either negative (* in D'') or positive (arrowhead in D'') for caspase 3. Arrow shows a cell positive for active caspase 3 but negative for γ H2AX. Bar = 15 μ m. (E,F) Squashes of the third interdigit at stage 6.5 (E) and 7.5 (F) to show the increase in active caspase immunolabeling in the course of interdigit regression, Bar = 10 μ m. G-G'' are confocal pictures of the interdigital mesoderm showing TUNEL (G, red) and γ H2AX (G', green) labeling 10 hr after the implantation at id 5.5 of a H₂O₂ bead (*). G'' is the merged image. Note the presence of cells positive for γ H2AX only (green), cells TUNEL-positive only (red), cells double-positive for γ H2AX and TUNEL (arrows in G''). Bar = 100 μ m.

Activation of caspases and γ H2AX labeling. The involvement of caspases in the degenerative process was explored by interdigital implantation of the pan-caspase inhibitor Q-VD-OPh. Beads containing Q-VD-OPh and implanted in the interdigits did not cause syndactyly, but they moderately inhibited the number of dying cells as detected by neutral red staining (Fig. 4A). Immunohistochemical analysis of these treated interdigits revealed that the number of TUNEL-positive, but not the number of γ H2AX-positive cells, was reduced in the area around the Q-VD-OPh-bead (Fig. 4B,C). Consistent with this finding, double immunolabeling for active caspase 3 and γ H2AX revealed the presence of three types of degenerating cells in the regressing interdigits: cells positive for γ H2AX but negative for active caspase 3; cells positive for active caspase 3 and negative for γ H2AX; and cells double-positive for caspase 3 and γ H2AX (Fig. 4D). The number of cells positive for active caspase 3 immunolabeling was more abundant at advanced stages of interdigit regression, and the intensity of labeling within each cell was also higher (Fig. 4E,F). In addition, cells double positive for active caspase 3 and γ H2AX exhibited signs of advanced degeneration, such as nuclear fragmentation. As expected, TUNEL-positive cells were positive for active caspase 3 as previously reported (not shown).

Oxidative stress and γ H2AX labeling. It is well known that interdigital tissue regression is accompanied by increased oxidative stress^{23,24}. Taking into account that oxidative stress is a major factor responsible for DNA damage, we investigated whether local increase in oxidative stress induced a pattern of cell degeneration similar to that observed during physiological regression. To this end, at id 5 or 5.5 we implanted in the prospective interdigit mesoderm heparin beads incubated in H₂O₂ (70 or 100 mM). Ten hours after bead implantation, a number of cells undergoing degeneration were observed around the bead. As shown in Fig. 4G, these cells showed a pattern of γ H2AX and TUNEL labeling similar to that found in the physiological regressing interdigits, including the presence of γ H2AX-only, TUNEL-only and TUNEL- γ H2AX double-positive cells (Fig. 4G-G'').

The chondrogenic potential of interdigital cells is fully conserved until the establishment of overt DNA damage and apoptotic degeneration. It is currently believed that cell death in embryonic systems is irreversibly and temporally programmed in the zones of prospective degeneration prior to the appearance of dying cells. The term “internal death clock” has been proposed to describe this phenomenon²⁵. In previous studies, we have shown that interdigital cells prior to cell death are fully competent to differentiate into cartilage and, *in vivo*, are able to form an extra-digit²⁶. Therefore, we looked to determine the stage at which the interdigit mesoderm loses chondrogenic potential relative to the appearance of DNA damage and massive apoptosis. To this end, we dissected the third interdigit of leg autopods at different stages of development and cultured the explants. As shown in Fig. 5, 100% of the interdigits at id 5.5 (n = 10) and 6 (n = 10) developed one or various cartilages. By id 7, the interdigits formed small cartilages, but this differentiation was still observed in 100% of the samples (n = 10). By id 7.5, the formation of cartilage was observed in 4 out of 10 cultured interdigits, and the size of the cartilage was significantly reduced in comparison to previous stages. These data argue against the occurrence of an internal death clock that is present in advance of the onset of degeneration.

Experimental induction of interdigital cell death replicates the degenerative sequence observed during physiological interdigit regression. Mouse genetic and chick microsurgical experimental studies have shown that the interdigital activation of BMPs induces the precocious degeneration of the AER rimming the interdigit and massive apoptosis in the interdigital mesoderm^{27,28}. In addition, the interdigital application of microbeads containing BMPs is followed by the precocious degeneration of the interdigital mesoderm, reproducing the physiologic regression mechanisms¹⁷. Labeling for neutral red and β -gal was almost unidentifiable at 3 and 6 hr after bead implantation (Fig. 6A,B,E,F). Beginning at 9 hr after bead implantation, both neutral red (Fig. 6C) and β -gal (Fig. 6G) labeling showed clear evidence of cell degeneration and senescence, respectively, which was increased in subsequent stages (Fig. 6D,H). In contrast, γ H2AX immunolabeling identified a zone of intense labeling in the mesoderm around the bead as early as 3 hr after bead implantation (Fig. 7A). At this short period, most of the degenerating cells were γ H2AX positive, and only few were TUNEL-positive. By 6 hr after bead implantation, the numbers of TUNEL- and γ H2AX-positive cells were balanced, and at later periods, TUNEL-positive cells were predominant (Fig. 7B,C).

Double treatment with BMP-beads and beads incubated with specific inhibitors of kinases implicated in DDR (ATM, ATR, or DNA-PKcs) delayed the appearance of γ H2AX expression within cells. The strongest inhibition was observed following co-treatment with Ku-60019, which selectively inhibits ATM (Fig. 7D). The weakest inhibition was obtained with co-treatments with inhibitors of ATR inhibitors.

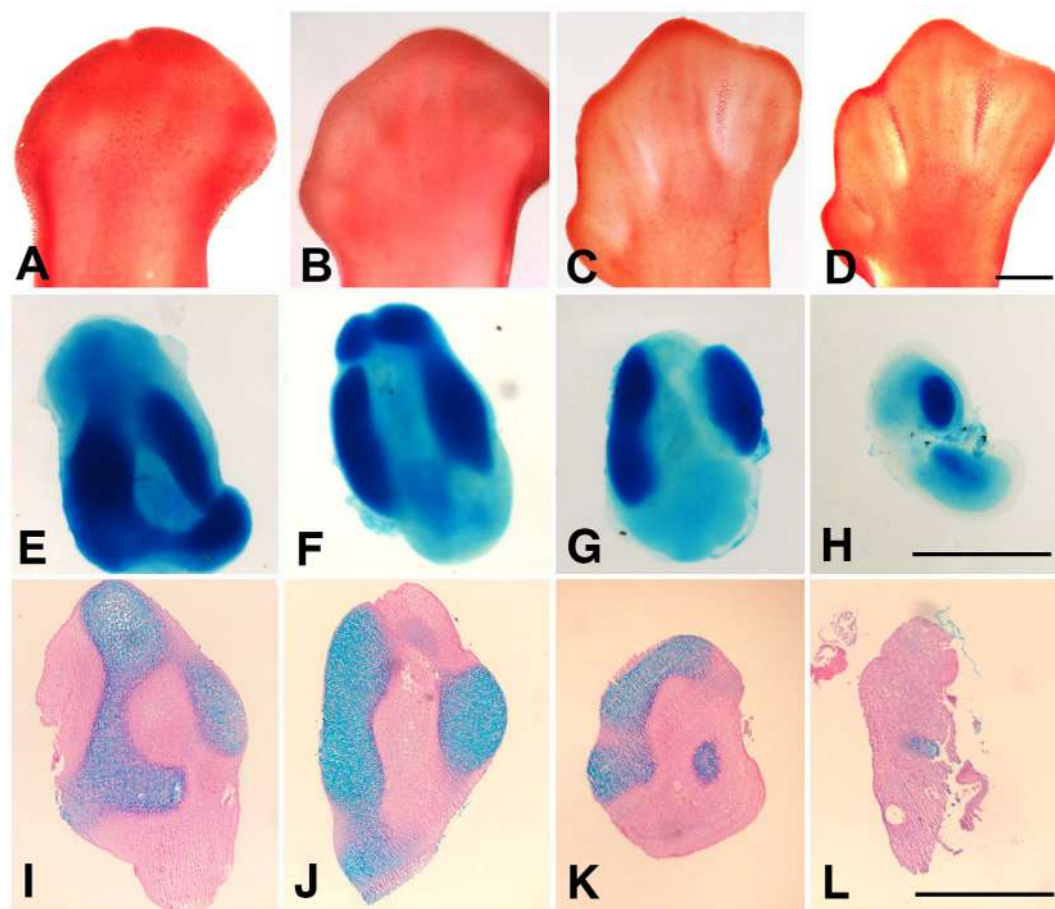


Figure 5. (A–D) Embryonic chick autopods at id 5.5 (A), 6 (B), 7 (C) and 7.5 (D) vital stained with neutral red to illustrate the sequence of interdigital cell death in the regressing interdigits. Bar = 300 μ m. (E–H) Interdigit explants from embryonic limbs at id 5.5 (E), 6 (F), 7 (G) and 7.5 (H) stained with alcian blue after 72 hr of culture to correlate the chondrogenic outcome relative to the stage of interdigital cell death shown in (A–D). Bar = 200 μ m. (I–L) Tissue sections of interdigit explants of limbs at id 5.5 (I), 6 (J), 7 (K), and 7.5 (L) cultured for 72 hr. The explants were first whole-mount stained with alcian blue and next paraffin wax embedded and sections stained with hematoxylin and eosin. Note the presence of alcian blue stained cartilage nodules in all samples. Bar = 200 μ m.

Discussion

The cellular basis of the remodeling processes that occurs during embryonic development has been the focus of intense research over the decades, yet the mechanisms remain poorly understood. The elimination of the interdigital tissue to sculpt the digits in the embryonic limb of vertebrates is a popular model for studying embryonic programmed cell death. At the cellular level, interdigit regression includes massive apoptosis²⁹, cell senescence¹², and lysosomal-mediated cell death^{9,10}. Our present findings demonstrate that prior to caspase activation, cells destined to die showed the activation of a DDR that involves the phosphorylation of histone H2AX and the nuclear recruitment of various DDR factors. Furthermore, the identification of γ H2AX-positive foci in other areas that undergo embryonic cell death, along with the absence of cell death phenotypes (except in the central nervous system) in mice deficient in caspases (reviewed by ref. 7), suggest that precocious DNA damage might be a general feature of embryonic programmed cell death. It is well known that DNA damage in adult and tumor tissues is followed by cell cycle arrest, cell senescence, and apoptosis^{16,18,30}. Based on these findings and considering the sequence of degeneration observed in this study, the damage to the DNA would be the primary event during interdigit regression, while apoptosis and senescence would occur downstream. Furthermore, the activation of the DNA repair mechanism in the interdigital mesoderm suggests that the interdigit regression process is more similar to an injury response resulting from genotoxic stress secondary to changes in local regulatory signals, rather than the traditional view of cellular “suicide” that ensures the outcome of a histogenetic or morphogenetic process in the embryo. Consistent with the hypothesis of an exogenous origin of the cell death signals, we observed that cultured interdigital explants differentiated into cartilage rather than dying even at advanced stages of degeneration. As mentioned above, this finding argues against the presence of an internal death clock that preprograms the initiation of the so-called “programmed cell death”²⁵.

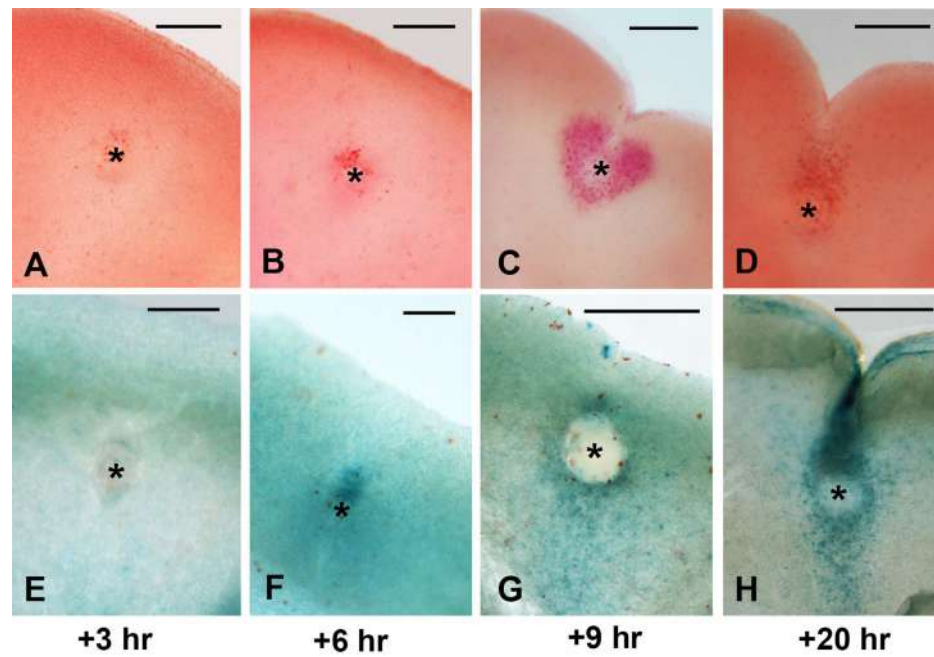


Figure 6. (A–D) Interdigital spaces showing the appearance of neutral red-positive labeling (A–D) and β -gal activity (E–H) at 3 (A,E), 6 (B,F), 9 (C,G) and 20 hr (D,H) after the implantation of a BMP-bead (*) at id 5.5. Note that positive labeling is first identified 6 hr after bead implantation, but an intense area of tissue regression is not observed until 9 hr after the implantation of a BMP bead. Bars = 200 μ m.

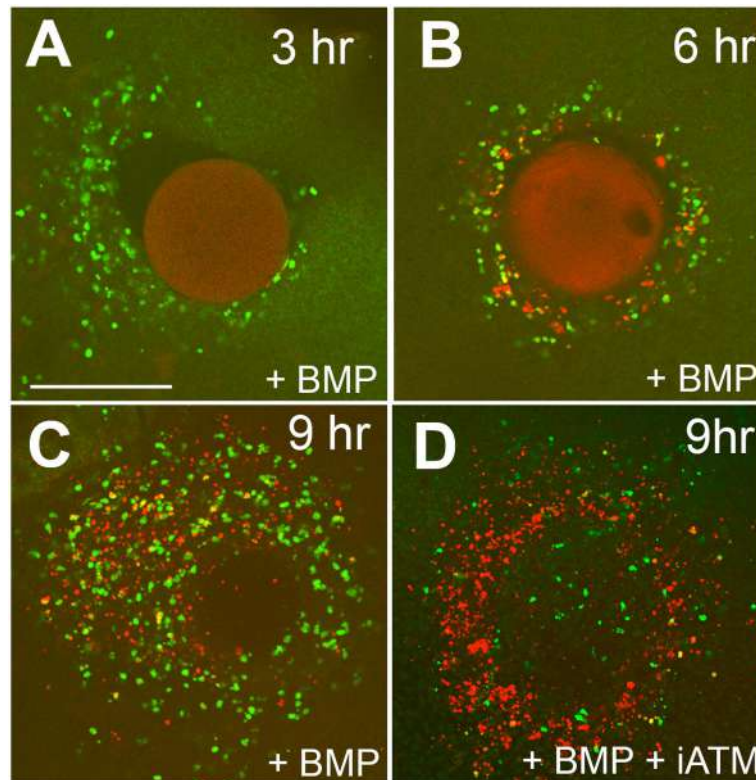


Figure 7. Distribution of γ H2AX (green)- and TUNEL (red)-positive cells in the interdigital mesoderm 3 (A), 6 (B) and 9 (C) hr after the implantation of a BMP bead. Note the precocious appearance of γ H2AX-positive cells 3 hr after bead implantation and the progressive increase of TUNEL-positive cells 6 and 9 hr after bead implantation. (D) Shows an interdigit 9 hr after the implantation of a BMP bead in combination with a bead incubated in Ku-60019 to inhibit ATM indicating a relative increase in the number of TUNEL-positive cells and a decrease in the number of γ H2AX-positive cells (compare with (C)). Bar = 140 μ m.

The presence of DDR markers along with apoptosis has been reported in embryonic and postnatal retinas and has been interpreted as either protecting³¹ or promoting³² the mechanism of tissue regression. Considering that the interdigital mesoderm is positive for ATM immunolabeling, the induction of caspase-positive apoptosis after the local inhibition of ATM indicates that DNA damage is a primary event during interdigit regression. ATM is activated by double-strand DNA breaks and phosphorylates H2AX at S139 forming γ H2AX that, in turn, changes the configuration of the chromatin and allows for the recruitment of different DNA repair proteins. TUNEL-positive cells that are negative for markers of DNA damage might represent cells that are induced to undergo cell death through the primary activation of caspases, most likely because the intensity of DNA damage precludes a defense response of DNA repair. It has been shown that cells during the course of DNA repair deliver paracrine factors that trigger apoptosis and promote cell senescence in the neighboring cells³⁰. In addition, the signals generated during DDR target the mitochondria promoting apoptosis³³. Hence, the temporal sequence in the appearance of TUNEL- and γ H2AX-positive cells and their relative numbers over the course of spontaneous or experimentally induced interdigital cell death strongly support our interpretation. Furthermore, we also observed that the number of TUNEL-positive, but not γ H2AX-positive cells, are reduced after treatments with a pan-caspase inhibitor. Our findings explain why interdigital tissue regression is delayed but not abrogated in mice deficient in the caspase activating factor APAF1¹³.

Although the identification of the cause of DNA damage was not a primary aim of this study, two potential factors could function in the system. Oxidative stress increases in the interdigits in the course of remodeling^{12,24,34}. ROS are major factors responsible for DNA damage and replicative stress in a variety of tumor and tissue types, and we have shown here that local application of H₂O₂ induces a pattern of degeneration similar to that occurring under physiological interdigit regression. A second, non-exclusive possibility is that DNA breaks are associated with changes in chromatin configuration induced by high motility transcription factors (HMG). These transcription factors compete with histone H1 to modify the functional structure of chromatin, and this function might involve the tight regulation of DNA breaks and repair mechanisms to ensure the integrity of the genome^{35,36}. In the regressing interdigits, various HMG genes including Hmgn1 and Sox9 are expressed (refs 37,38 and personal observations). Sox9 in combination with HMGN1³⁷ and Tgf β signaling³⁹ plays a central role in determining whether skeletal progenitors differentiate into chondrocytes or remain undifferentiated to be removed via induced cell death. High levels of Sox9 lead to chondrogenesis and the absence of Sox9 results in massive cell death⁴⁰. Furthermore, the interdigital application of Tgf β induces the intense and precocious (30 min) up-regulation of Sox9, which prevents cells from dying and instead induces cartilage differentiation³⁹.

In summary, our study proposes a new biological paradigm for embryonic cell death. Unlike previous interpretations of the programmed fate of specific tissue components of the embryo, our findings indicate that cells are removed because they receive noxious stimuli. Based on our results, cell death is not a positive cell behavior but rather cells try to survive to local stress.

References

- Glucksmann, A. Cell deaths in normal vertebrate ontogeny. *Biol. Rev. Camb. Philos. Soc.* **26**, 59–86 (1951).
- Kerr, J. F., Wyllie, A. H. & Currie, A. R. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br. J. Cancer* **26**, 239–257 (1972).
- Suzanne, M. & Steller, H. Shaping organisms with apoptosis. *Cell Death Differ.* **20**, 669–675 (2013).
- D'Amelio, M., Cavallucci, V. & Cecconi, F. Neuronal caspase-3 signaling: not only cell death. *Cell Death Differ.* **17**, 1104–1114 (2010).
- Hurle, J. M. Regenerative versus destructive cell death in developing systems and tissue homeostasis (retrospective on doi: 10.1002/bies.201200018). *Bioessays* **36**, 1020 (2014).
- Hurle, J. M., Ros, M. A., Climent, V. & Garcia-Martinez, V. Morphology and significance of programmed cell death in the developing limb bud of the vertebrate embryo. *Microsc. Res. Tech.* **34**, 236–246 (1996).
- Lorda-Diez, C. I., Montero, J. A., Garcia-Porrero, J. A. & Hurle, J. M. Interdigital tissue regression in the developing limb of vertebrates. *Int. J. Dev. Biol.* **59**, 55–62 (2015).
- Zuzarte-Luis, V., Berciano, M. T., Lafarga, M. & Hurle, J. M. Caspase redundancy and release of mitochondrial apoptotic factors characterize interdigital apoptosis. *Apoptosis* **11**, 701–715 (2006).
- Zuzarte-Luis, V., Montero, J. A., Kawakami, Y., Izpisua-Belmonte, J. C. & Hurle, J. M. Lysosomal cathepsins in embryonic programmed cell death. *Dev. Biol.* **301**, 205–217 (2007).
- Montero, J. A. *et al.* Coordinated and sequential activation of neutral and acidic DNases during interdigital cell death in the embryonic limb. *Apoptosis* **15**, 1197–1210 (2010).
- Deussing, J. *et al.* Cathepsins B and D are dispensable for major histocompatibility complex class II-mediated antigen presentation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **95**, 4516–4521 (1998).
- Lorda-Diez, C. I. *et al.* Apoptosis during embryonic tissue remodeling is accompanied by cell senescence. *Aging (Albany NY)* **7**, 974–985 (2015).
- Chautan, M., Chazal, G., Cecconi, F., Gruss, P. & Golstein, P. Interdigital cell death can occur through a necrotic and caspase-independent pathway. *Curr. Biol.* **9**, 967–970 (1999).
- Rich, T., Allen, R. L. & Wyllie, A. H. Defying death after DNA damage. *Nature* **407**, 777–783 (2000).
- Lu, C. *et al.* Cell apoptosis: requirement of H2AX in DNA ladder formation, but not for the activation of caspase-3. *Mol. Cell* **23**, 121–132 (2006).
- Cook, P. J. *et al.* Tyrosine dephosphorylation of H2AX modulates apoptosis and survival decisions. *Nature* **458**, 591–596 (2009).
- Zuzarte-Luis, V. *et al.* A new role for BMP5 during limb development acting through the synergic activation of Smad and MAPK pathways. *Dev. Biol.* **272**, 39–52 (2004).
- Redon, C. E. *et al.* Recent developments in the use of gamma-H2AX as a quantitative DNA double-strand break biomarker. *Aging (Albany NY)* **3**, 168–174 (2011).
- Hurle, J. M., Lafarga, M. & Ojeda, J. L. Cytological and cytochemical studies of the necrotic area of the bulbus of the chick embryo heart: phagocytosis by developing myocardial cells. *J. Embryol. Exp. Morphol.* **41**, 161–173 (1977).
- Hurle, J. M. & Ojeda, J. L. Cell death during the development of the truncus and conus of the chick embryo heart. *J. Anat.* **129**, 427–439 (1979).
- Lorda-Diez, C. I., Montero, J. A., Diaz-Mendoza, M. J., Garcia-Porrero, J. A. & Hurle, J. M. Defining the earliest transcriptional steps of chondrogenic progenitor specification during the formation of the digits in the embryonic limb. *PLoS One* **6**, e24546 (2011).

22. Solier, S. & Pommier, Y. MDC1 cleavage by caspase-3: a novel mechanism for inactivating the DNA damage response during apoptosis. *Cancer Res.* **71**, 906–913 (2011).
23. Schnabel, D. *et al.* Expression and regulation of antioxidant enzymes in the developing limb support a function of ROS in interdigital cell death. *Dev. Biol.* **291**, 291–299 (2006).
24. Eshkar-Oren, I., Krief, S., Ferrara, N., Elliott, A. M. & Zelzer, E. Vascular patterning regulates interdigital cell death by a ROS-mediated mechanism. *Development* **142**, 672–680 (2015).
25. Saunders, J. W. J. & Fallon, J. F. Cell death in morphogenesis. In: Major Problems in Developmental Biology. *M. Loxke ed. Academic Press, New York pp.* **1**, 289–314 (1967).
26. Montero, J. A., Lorda-Diez, C. I., Ganan, Y., Macias, D. & Hurle, J. M. Activin/TGF β and BMP crosstalk determines digit chondrogenesis. *Dev. Biol.* **321**, 343–356 (2008).
27. Ganan, Y., Macias, D., Basco, R. D., Merino, R. & Hurle, J. M. Morphological diversity of the avian foot is related with the pattern of *msx* gene expression in the developing autopod. *Dev. Biol.* **196**, 33–41 (1998).
28. Selever, J., Liu, W., Lu, M. F., Behringer, R. R. & Martin, J. F. Bmp4 in limb bud mesoderm regulates digit pattern by controlling AER development. *Dev. Biol.* **276**, 268–279 (2004).
29. Garcia-Martinez, V. *et al.* Internucleosomal DNA fragmentation and programmed cell death (apoptosis) in the interdigital tissue of the embryonic chick leg bud. *J. Cell. Sci.* **106** (Pt 1), 201–208 (1993).
30. Malaquin, N., Carrier-Leclerc, A., Dessureault, M. & Rodier, F. DDR-mediated crosstalk between DNA-damaged cells and their microenvironment. *Front. Genet.* **6**, 94 (2015).
31. Baleriola, J., Suarez, T. & de la Rosa, E. J. DNA-PK promotes the survival of young neurons in the embryonic mouse retina. *Cell Death Differ.* **17**, 1697–1706 (2010).
32. Martin-Oliva, D. *et al.* DNA damage, poly(ADP-Ribose) polymerase activation, and phosphorylated histone H2AX expression during postnatal retina development in C57BL/6 mouse. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* **56**, 1301–1309 (2015).
33. Fang, E. F. *et al.* Nuclear DNA damage signalling to mitochondria in ageing. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **17**, 308–321 (2016).
34. Salas-Vidal, E. *et al.* Reactive oxygen species participate in the control of mouse embryonic cell death. *Exp. Cell Res.* **238**, 136–147 (1998).
35. Beato, M., Wright, R. H. & Vicent, G. P. DNA damage and gene transcription: accident or necessity? *Cell Res.* **25**, 769–770 (2015).
36. Singh, I. *et al.* High mobility group protein-mediated transcription requires DNA damage marker gamma-H2AX. *Cell Res.* **25**, 837–850 (2015).
37. Furusawa, T. *et al.* Down-regulation of nucleosomal binding protein HMGN1 expression during embryogenesis modulates Sox9 expression in chondrocytes. *Mol. Cell. Biol.* **26**, 592–604 (2006).
38. Zhao, X., Brade, T., Cunningham, T. J. & Duester, G. Retinoic acid controls expression of tissue remodeling genes *Hmgn1* and *Fgf18* at the digit-interdigit junction. *Dev. Dyn.* **239**, 665–671 (2010).
39. Chimal-Monroy, J. *et al.* Analysis of the molecular cascade responsible for mesodermal limb chondrogenesis: Sox genes and BMP signaling. *Dev. Biol.* **257**, 292–301 (2003).
40. Akiyama, H., Chaboissier, M. C., Martin, J. F., Schedl, A. & de Crombrughe, B. The transcription factor Sox9 has essential roles in successive steps of the chondrocyte differentiation pathway and is required for expression of Sox5 and Sox6. *Genes Dev.* **16**, 2813–2828 (2002).

Acknowledgements

Thanks are due to Montse Fernandez-Calderon, Sonia Perez-Mantecón and Susana Dawalibi for technical assistance. This work was supported by a Grant (BFU2014-54026P) from the Spanish Science and Innovation Ministry to J.M.H.

Author Contributions

Conceived and designed the experiments: C.I.L.-D., J.A.M., C.S.-F., J.A.G.-P. and J.M.H. Performed the experiments: C.I.L.-D., J.A.M., C.S.-F., J.A.G.-P. and J.M.H. Analyzed the data: C.I.L.-D., J.A.M., C.S.-F., J.A.G.-P. and J.M.H. Writing of the manuscript: J.A.M. and J.M.H.

Additional Information

Supplementary information accompanies this paper at <http://www.nature.com/srep>

Competing financial interests: The authors declare no competing financial interests.

How to cite this article: Montero, J. A. *et al.* DNA damage precedes apoptosis during the regression of the interdigital tissue in vertebrate embryos. *Sci. Rep.* **6**, 35478; doi: 10.1038/srep35478 (2016).



This work is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons license, unless indicated otherwise in the credit line; if the material is not included under the Creative Commons license, users will need to obtain permission from the license holder to reproduce the material. To view a copy of this license, visit <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>

© The Author(s) 2016

ARTICLE

Open Access

UHRF genes regulate programmed interdigital tissue regression and chondrogenesis in the embryonic limb

Cristina Sanchez-Fernandez¹, Carlos I. Lorda-Diez¹, Juan A. García-Porrero¹, Juan A. Montero¹ and Juan M. Hurlé¹

Abstract

The primordium of the limb contains a number of progenitors far superior to those necessary to form the skeletal components of this appendage. During the course of development, precursors that do not follow the skeletogenic program are removed by cell senescence and apoptosis. The formation of the digits provides the most representative example of embryonic remodeling via cell degeneration. In the hand/foot regions of the embryonic vertebrate limb (autopod), the interdigital tissue and the zones of interphalangeal joint formation undergo massive degeneration that accounts for jointed and free digit morphology. Developmental senescence and caspase-dependent apoptosis are considered responsible for these remodeling processes. Our study uncovers a new upstream level of regulation of remodeling by the epigenetic regulators *Uhrf1* and *Uhrf2* genes. These genes are spatially and temporally expressed in the pre-apoptotic regions. UHRF1 and UHRF2 showed a nuclear localization associated with foci of methylated cytosine. Interestingly, nuclear labeling increased in cells progressing through the stages of degeneration prior to TUNEL positivity. Functional analysis in cultured limb skeletal progenitors via the overexpression of either UHRF1 or UHRF2 inhibited chondrogenesis and induced cell senescence and apoptosis accompanied with changes in global and regional DNA methylation. Uhrfs modulated canonical cell differentiation factors, such as Sox9 and Scleraxis, promoted apoptosis via up-regulation of Bak1, and induced cell senescence, by arresting progenitors at the S phase and upregulating the expression of p21. Expression of *Uhrf* genes in vivo was positively modulated by FGF signaling. In the micromass culture assay *Uhrf1* was down-regulated as the progenitors lost stemness and differentiated into cartilage. Together, our findings emphasize the importance of tuning the balance between cell differentiation and cell stemness as a central step in the initiation of the so-called “embryonic programmed cell death” and suggest that the structural organization of the chromatin, via epigenetic modifications, may be a precocious and critical factor in these regulatory events.

Introduction

The autopod is a paddle shaped structure consisting of a core of skeletal progenitors covered by the ectoderm. During the course of development, the progenitors aggregate to form radial digit condensations separated by

interdigital regions. Cells in the interdigital regions are initially undifferentiated but soon follow massive degeneration that sculpts the digit contours. In chick and mouse embryos the elimination of the interdigital tissue lasts more than 30 h. During this period the interdigital cells retain stemness to respond to differentiation signals to form ectopic digits¹.

The control of interdigit remodeling has been the subject of intense research. Morphological and molecular analyses revealed the redundant involvement of several degenerative pathways including canonical apoptosis, cell death

Correspondence: Juan M. Hurlé (hurlej@unican.es)

¹Departamento de Anatomía y Biología Celular and IDIVAL, Universidad de Cantabria, 39011 Santander, Spain

These authors contributed equally: Cristina Sanchez-Fernandez, Carlos I. Lorda-Diez

Edited by J. Chipuk

© The Author(s) 2019



Open Access This article is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License, which permits use, sharing, adaptation, distribution and reproduction in any medium or format, as long as you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons license, and indicate if changes were made. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons license, unless indicated otherwise in a credit line to the material. If material is not included in the article's Creative Commons license and your intended use is not permitted by statutory regulation or exceeds the permitted use, you will need to obtain permission directly from the copyright holder. To view a copy of this license, visit <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>.

associated with lysosomal activation^{2,3}, and cell senescence⁴. All these degenerative routes are preceded by intense DNA damage⁵, which is suggestive of common upstream regulation. BMPs have been identified as active factors responsible for interdigit regression. However, while the interdigital application of exogenous BMPs in the embryonic limb induces cell death and DNA damage, the same BMPs stimulate cell proliferation and differentiation in the tip of the fingers, that are also constituted by the same skeletal progenitors⁶. This finding suggests that complementary signals cooperate with BMPs to trigger the degenerative events. The hypothesis of the present study is that the embryonic degenerative processes may share regulatory factors occurring in tumor tissues. DNA damage, cell senescence, and apoptosis are associated with epigenetic and chromatin architecture alterations of cancerous cells⁷ that may determine tumorigenesis and sensitivity to chemotherapy and irradiation^{8,9}.

In this study, we analyzed whether ubiquitin-like containing plant homeodomain and RING finger domain (UHRF) epigenetic modulators 1 and 2 participate in the degenerative processes associated with digit development. This gene family is functionally associated with DNA damage and participates in the regulation of proliferation and cell survival of numerous malignancies¹⁰. UHRF proteins are complex factors containing four functional domains that modulate transcriptional regulation via chromatin modifications. *Uhrf* genes are upregulated in many cancer cells and may behave as either oncogenes or tumor suppressors¹⁰. Depletion of UHRF1 increases the chemosensitivity of cancer cells to hydroxyurea resistance¹¹ and increases their sensitivity to gamma-irradiation¹². UHRF2, in turn, has been characterized as a component of the ubiquitin proteasome degradation machinery¹³ with pro-apoptotic functions in oncogenestressed cells¹⁴. The significance of *Uhrf* genes in developmental systems has received less attention. Mice and zebrafish deficient in UHRF1 die during the course of development^{15,16}, and embryonic stem cells null for UHRF1 are hypersensitive to DNA-damaging agents¹⁵. Furthermore, *Uhrf1* knockout directed to limb mesoderm implicates this protein in appendicular development¹⁷, as these mice show shortened long bones and dysregulated chondrocyte maturation and proliferation via alterations of the growth plate. *Uhrf2* knockout mice are viable and lack morphological defects¹⁸, but there is evidence of its implication in the pathogenesis of neurodegenerative diseases¹⁹. Here, we show that *Uhrf1* and *Uhrf2* genes are expressed in the interdigital mesoderm and interphalangeal joints where undifferentiated cells undergo senescence and apoptosis. At protein level UHRFs associated with zones of DNA methylation. Functional analysis via the overexpression of either UHRF1 or UHRF2 inhibited chondrogenesis and induced cell senescence and

apoptosis of cultured limb skeletal progenitors accompanied with changes in global and regional DNA methylation. In a complementary fashion, knockdown of these genes stimulated chondrogenesis and inhibited cell death and senescence. We identified Sox9, Scleraxis, Bak1, and p21 as potential transcriptional targets responsible for its function in the developing digit model.

Materials and methods

We employed Rhode Island chicken embryos from day 4 to day 8.5 of incubation (id) equivalent to stages 23–34 HH, and C57BL6 mouse embryos ranging from 12 to 14.5 days post coitum (pc).

In situ hybridization and analysis of cell proliferation

In situ hybridization of PFA-fixed limb specimens was performed in whole mount or 100- μ m vibratome sections. The samples were treated with 10 μ g/ml of proteinase K for 20–30 min at 20 °C. Hybridization with digoxigenin-labeled antisense RNA probes was performed at 68 °C. Alkaline phosphatase-conjugated antidigoxigenin antibody (dilution 1:2000) was used (Roche). Reactions were developed with BM Purple AP Substrate precipitation (Roche).

The probes for *Uhrf1* and *Uhrf2* were obtained by PCR from RNA extracted from chick or mouse limb buds at initial stages of digit formation. Specific primers for chick *Uhrf1* were: 5'-tccacatctattgcctcaacc-3' and 5'-gaacacacgattcgctcacc-3'; for chick *Uhrf2* 5'-agagttcaggtgagcgaagc-3' and 5'-aggctcaacgtcatctctcc-3 and for mouse *Uhrf1*: 5'-tgactctggctatggtgtgg-3' and 5'-gcctgatgttgccgtatagc-3'; and for mouse *Uhrf2* 5'-agagttcaggtgagcgaagc-3' and 5'-tcgttcgattcctctgagg-3'.

The distribution of proliferating cells in the autopod was analyzed in paraffin-embedded tissue sections by detection of bromodeoxyuridine (BrdU) incorporation 60 min after injection into the amniotic sac of 100 μ l of BrdU solution (100 mg/ml).

Cell senescence, neutral red vital staining, TUNEL assay, and immunofluorescence

The β -galactosidase activity assay²⁰ was performed at pH 6 in vibratome sections of limb autopods fixed in 4% glutaraldehyde.

Neutral red staining, TUNEL assay, and electron microscopy were performed as described previously².

Immunolabeling was performed in limb tissue samples fixed in 4% PFA. We employed both squashed interdigital tissue fragments or vibratome sections permeabilized with Triton X-100 in PBS. The following antibodies were employed: rabbit monoclonal anti-UHRF1 (DSG8E, Cell Signaling), rabbit polyclonal anti-UHRF2 (TA337863, OriGene); mouse monoclonal anti-UHRF2 (sc-398953, Santa Cruz Biotechnology); mouse monoclonal anti-5-

methylcytosine (5-mC; 33D3, Eurogentech); rabbit polyclonal anti-SOX9 (AB5535, Milipore); mouse monoclonal anti-γH2AX (JBW301, Milipore-Upstate); and mouse monoclonal anti-BdrU (BU-33, Sigma Aldrich). Counterstaining to distinguish nucleus and cytoplasm was performed using fluorescent-phalloidin (Sigma Aldrich) or DAPI (Vector Laboratories). Observation were made with a LSM510 laser confocal microscope (Zeiss).

In vivo treatments

The transcriptional effects of FGF signaling in the expression of *Uhrf* genes were studied by analyzing the effects of the local administration of FGF2 (diluted at 0.5 mg/ml, Peprotech), and the FGF inhibitor SU5402 (diluted at 4 mg/ml, Calbiochem), using heparin acrylic (Sigma) or ion exchange (AG1-X2, Bio-Rad) microbeads as described²¹.

Mesodermal cultures

Dissociated undifferentiated mesoderm from chick leg autopods at 4.5 i.d. (25 HH) were cultured as micromasses containing a density of 2.0×10^7 cells/ml. The chondrogenic outcome was studied under the microscope after Alcian blue staining (0.5% Alcian blue, at pH 1.0). Chondrogenesis was further quantified by the detection of Alcian blue dye extracted in 6 M guanidine-HCl (pH 5.8), and the optical density was measured at 600 nm.

Cell nucleofection and targeted gene silencing

Functional studies were performed by gain-of-function and loss-of-function approaches.

For gain-of-function experiments, skeletal progenitors were electroporated with constructs of chicken *Uhrf1* (cUhrf1; OGa47434) or *Uhrf2* genes (cUhrf2; OGa21255) cloned into the pcDNA3.1 vector (GenScript) employing the Multiporator System (Eppendorf) and cultured under high-density conditions as indicated above. For loss-of-function experiments, skeletal progenitors were electroporated with a short hairpin RNAi against *Uhrf1* (*sh-Uhrf1*) or *Uhrf2* (*sh-Uhrf2*) cloned into the pcU6-1-shRNA (a generous gift from Dr. Tim J. Doran). Transfections with the respective empty plasmids were employed as controls. After 48 h of culture, the level of gene regulation was confirmed by q-PCT and/or Western blot analysis.

Evaluation of DNA methylation

Changes in global methylation after Uhrf functional experiments were determined by the ELISA-based commercial kit Imprint® Methylated DNA Quantification (MDQ1; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA). One hundred and fifty nanograms of genomic DNA from our samples were incubated with capture and detection antibodies and their absorbance was measured at 450 nm. The amount of methylated DNA present in the samples is

proportional to the absorbance measured. Quantification of global DNA methylation was performed calculating methylation levels relative to the methylated control DNA (50 ng/μl) using the formula: $[(A450 \text{ av sample} - A450 \text{ av blank}) / (A450 \text{ av methylated control DNA} - A450 \text{ av blank})] \times 100$.

We next selected Bak1 as potential target of Uhrf genes in the control of cell death. Changes in the methylation status of its promoter were studied by methylation sensitive restriction enzyme and quantitative polymerase chain reaction (MSRE-qPCR). Primers were designed using Primer3Plus online software. The selected PCR primer pair flanked the region of interest (based on the presence of informative restriction sites) within the promoter of Bak1: Fwd, AGCTGCAGCCTTCCCAGA; Rev, CTCTAGAGGCGCCTTGCAC. Genomic DNA samples were digested with a CpG-methylation-sensitive restriction enzyme (TauI (3 U/μl); ER1651 ThermoFisher Scientific) or with a non-CpG-methylation-sensitive enzyme (SacI (10 U/μl); ER1132 ThermoFischer Scientific) for 2 h according to the manufacturer's suggested temperature. SYBRGreen-based qPCR was carried out in triplicates with a total volume of 20 μl per tube containing 1 μl of genomic DNA (TauI-digested, SacI-digested, or undigested DNA), 0.4 μl of each primer, 10 μl of SYBR Select Master Mix (Life Technologies), and 8.2 μl of H₂O. Reactions were carried out in a StepOne Real Time System and analyzed by StepOne software v2.3 (Life Technologies). The relative percentage of methylated DNA was calculated according to the equation $2^{-\Delta\Delta C_t}$ employing as normalizers the C_t values of both SacI digested and undigested samples²².

Western blot analysis

The total amount of UHRF proteins in control and treated tissue samples was evaluated by Western blot analysis. Total proteins were extracted by lysis from interdigits or dissociated micromass cultures. After determining the protein concentration, 30 μg of each sample was loaded onto a 12.5% SDS polyacrylamide gel, electrophoresed and transferred to PVDF membranes. The membranes were incubated with primary antibodies (see "Immunofluorescence" section). Protein bands were detected with an OdysseyTM Infrared-Imaging System (Li-Cor Biosciences). Immunoblots were developed with anti-mouse IRDye800DX or anti-rabbit IRDye680DX as secondary antibodies (Rockland Immunochemicals, USA).

Flow cytometry

Control, *Uhrf1* or *Uhrf2* gene-overexpressing, or *Uhrf1* or *Uhrf2* gene-silenced cultures were dissociated. One million cells were used in each test. For propidium iodide (PI) staining, the cells were washed with PBS and fixed in 90% ethanol. The samples were incubated overnight at

4 °C with 0.1% sodium citrate, 0.01% Triton X-100, and 0.1 mg/ml PI. The cell suspension was subjected to flow cytometry analysis in a Cytoflex (Beckman Coulter) and analyzed with the Cytexpert software.

Real-time quantitative PCR (q-PCR) for gene expression analysis

Total RNA was extracted using the NucleoSpin RNA kit (Macherey-Nagel). First-strand cDNA was synthesized using random hexamers and the High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Life Technologies). The cDNA concentration was adjusted to 0.5 µg/µl. SYBRGreen (Life Technologies)-based q-PCR was performed using the Mx3005P system (Stratagene). Rpl13 was chosen as the normalizer in interdigital samples and Gapdh in cultures. Mean values for fold changes were calculated. Expression level was evaluated relative to a calibrator according to the $2^{-\Delta\Delta Ct}$ equation. Each value represents the mean \pm SEM of at least four independent samples obtained under the same conditions. Data were analyzed using Student's *t*-test or ANOVA followed by Bonferroni test for post-hoc comparisons. Statistical significance was set at $p < 0.05$. q-PCR-specific primers analyzed in this study would be provided upon request.

Results

Interdigital and interphalangeal joint expression domains of UHRF1 and UHRF2 in the embryonic limb

A preliminary search for the interdigital expression of epigenetic regulators revealed high expression levels of *Uhrf1* and *Uhrf2* genes compared with interdigital gene markers²³ (Supplementary Fig. 1). Therefore, we generated probes to explore their expression by in situ hybridization. As shown in Fig. 1a–j, *Uhrf* genes show similar expression pattern in the interdigital mesoderm, preceding (id 5–6) and during the whole remodeling period (id 6.5–8; Fig. 1a–j). This period is characterized by proliferation arrest^{24,25} (Fig. 1m), and degeneration detectable by β -galactosidase labeling (Fig. 1o), neutral red vital staining (Fig. 1p), γ H2AX immunolabeling (DNA damage marker; Fig. 1q), and TEM (Fig. 1r). Analysis of the gene expression in tissue sections (Fig. 1e, j) detected additional domains in the developing interphalangeal joints that mark a region where cells also undergo programmed cell death and senescence (Fig. 1o). Quantification of interdigital gene expression showed that *Uhrf1*, after a short downregulation preceding id 6, maintained in subsequent stages expression levels higher than other interdigital tissue markers (Fig. 1k, see also Supplementary Fig. 1). In contrast, the expression level of *Uhrf2* remained relatively constant throughout the course of tissue remodeling (Fig. 1l). Western blot analysis confirmed the presence of high levels of UHRF1 and UHRF2 proteins through the course of interdigit remodeling (Fig. 1n).

A similar expression pattern for both genes was observed in mouse embryos. As shown in Fig. 2, by day 12 pc, *Uhrf* genes are expressed in the undifferentiated autopodial mesoderm and in subsequent stages, expression becomes restricted to the interdigital mesoderm. By day 14 pc, interdigit regression is almost accomplished and *Uhrf* gene expression become restricted to the zones of joint formation (Fig. 2d, h).

Cellular distribution of UHRF in the interdigital mesoderm

The protein distribution was analyzed by immunofluorescence in mouse and chick interdigits (Figs. 3 and 4). Both proteins showed a diffuse pattern throughout the nucleus with distinctive foci of labeling intensification (Figs. 3a and 4a). Moderate cytoplasmic immunolabeling was also observed (Fig. 4a). The association of UHRF proteins with epigenetic markers and degenerative events was next explored (Figs. 3b–d and 4b–d). We first analyzed the relation between UHRF proteins and methylated DNA monitored with 5-mC immunolabeling. In chick cells, 5-mC immunolabeling appeared as dots of variable size (Fig. 3b' and c', and 4c'). In mouse cells, 5-mC labeling appeared as characteristic rings (Fig. 4b'). In both species UHRF1 and UHRF2 spots were often associated with 5-mC-positive marks. Of note, UHRF proteins often occupied the core of the 5-mC rings in mouse cells (inset of Fig. 3b'', and Fig. 4b''). Colocalization of UHRF proteins with 5-mC foci were appreciated for UHRF1 (Fig. 3b). This overlapping expression is consistent with the demonstrated role of UHRF1 in recruiting DNA methyltransferase 1 and histone deacetylase 1 to chromatin regions containing CpG dinucleotides. Of relevance, immunolabeling for both UHRF1 and 2 appeared intensified at the initial stages of the dying process (Figs. 3c and 4c). These initial stages of cell degeneration are identified by a progressive loss and peripheral displacement of 5-mC labeling. In contrast, at stages of overt apoptosis UHRF positivity was lost (Figs. 3d and 4d).

Regulation of *Uhrf* gene expression by FGF signaling

The growth and differentiation of the limb skeletal progenitors is controlled by FGFs. FGFs maintain proliferation and delay cell death and chondrogenic differentiation^{21,26–28}. The degeneration of the interdigital tissue and the completion of digit formation are associated with the extinction of FGF signaling. Therefore, we investigate the influence of FGFs on the expression of UHRF genes. As shown in Fig. 5a–f, the expression levels of FGF8 and FGF10, which are the most characteristic *FGF* genes expressed in the autopod at the studied stages, become downregulated at id 6 (Fig. 5a–f). As described above (Fig. 1k), id 6 is the period that marks the decreased expression of *Uhrf1*. In subsequent stages, when downregulation of FGFs is intensified, both *Uhrf1* and *Uhrf2*

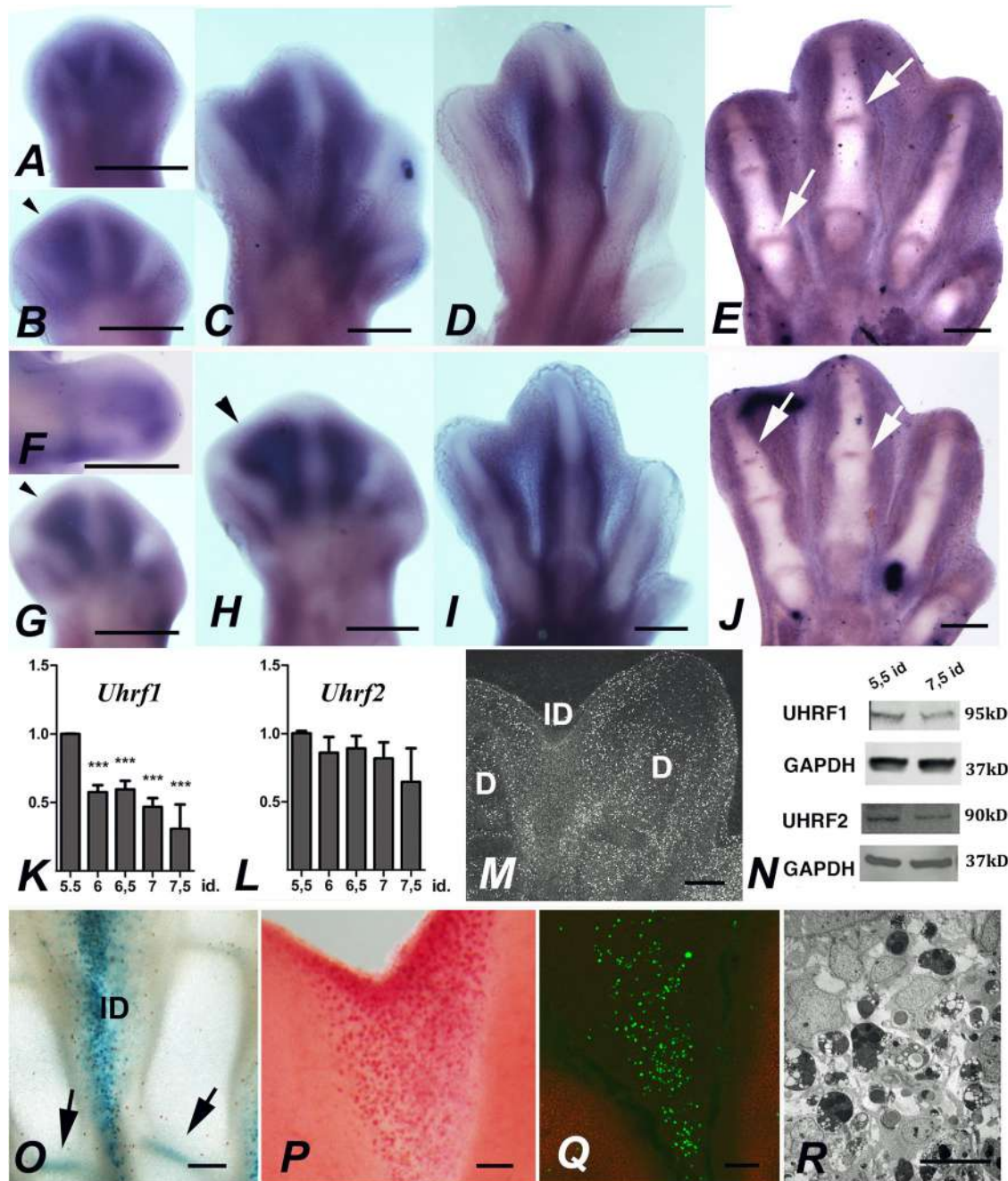


Fig. 1 *Uhrf* genes are expressed in the remodeling interdigits. Expression of *Uhrf1* (a–e) and *Uhrf2* (f–j) in the interdigital tissue and joint forming regions of chick leg buds. Whole mount in situ hybridizations at id 5 (a), 4.5 (f), 5.5 (b and g), 6.5 (c, h), and 7.5 (d, i). Arrowheads in g and h show a characteristic absence of *Uhrf2* transcripts in the subridge mesoderm. e and j are in situ hybridizations in vibratome tissue sections at id 7.5 to show the joint domains (arrows) of *Uhrf1* (e), and *Uhrf2* (j). k and l are charts showing the expression levels of *Uhrf1* (k) and *Uhrf2* (l) in the course of interdigit tissue remodeling, considering a value of 1 for id 5.5. Note the decreased expression of *Uhrf1* between id 5.5 and 6. m BrdU incorporation to mark mitosis in the autopod at id 6. Note the almost absence of cells labeled in the interdigital tissue (ID) compared with the digit regions (d). n Western blotting showing the UHRF1 and UHRF2 proteins in the interdigital tissue at id 5.5 and 7.5 the stage preceding and the peak of degeneration. o–r illustrations of the most characteristic features of the third interdigit in autopods at the peak of degeneration (id 7.5). o Senescence-specific beta-galactosidase activity. Note positivity in the interdigit (ID) and in the developing joints (arrows); p interdigit after neutral red vital staining; q immunolabeling with anti-γ-H2AX showing interdigital cells undergoing DNA damage. Digit rays are labeled red with anti-Sox9; r transmission electron microscopic image to show the abundance of dark apoptotic cells in the interdigital mesoderm. *** $p < 0.001$. Bars = 200 μm (a–j, m, o–q). Bar = 15 μm (r)

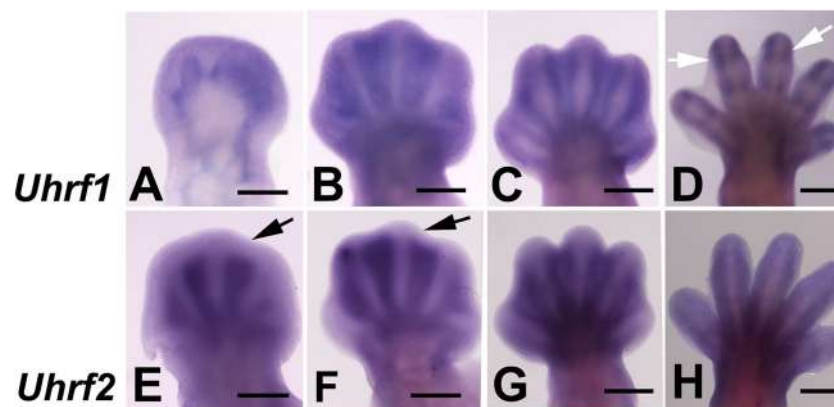


Fig. 2 In situ hybridizations showing the expression of *Uhrf1* (a–d) and *Uhrf2* (e–h) in the mouse autopod during interdigit remodeling. a–d show the expression of *Uhrf1* at pc days 12 (a), 13 (b), 13.5 (c), and 14 (d). Note the presence of joint domains by pc 14 (arrows in d). e–h show the expression of *Uhrf2* at pc days 12.5 (e), 13 (f), 13.5 (g), and 14 (h). Note the fading of the interdigital domains in the distal subectodermal region (arrows in e and f). Bars = 500 μ m

remain expressed at high levels. Interdigital application of a FGF-bead moderately upregulated the expression of *Uhrf1* (Fig. 5g, h and j), but not *Uhrf2* (Fig. 5k–l and n). In contrast, the local application of the FGF inhibitor SU5402 downregulated both *Uhrf* genes (Fig. 5i, j, and m, n). Together, these findings suggest that FGF signaling promotes only the expression of *Uhrf1* but sustains the expression of both *Uhrf* genes.

Expression and functional analysis of *Uhrf* genes during chondrogenic differentiation

The absence of *Uhrf* transcripts in the differentiating digit rays revealed these factors as potential inhibitors of chondrogenic differentiation. To test this hypothesis we monitored their expression in micromass cultures of limb skeletal progenitors (Fig. 6). This in vitro assay mimics the process of digit cartilage differentiation in vivo. The skeletal progenitors grow initially in an undifferentiated state, but by 48 h of culture, they aggregate to form chondrogenic nodules (Fig. 6a). The nodules are separated from each other by cells that retain morphological and transcriptional characteristics of fibrous connective tissue²⁹. In subsequent days of culture, the chondrogenic nodules increased in number and size (Fig. 6a–c), forming by the end of the second week an almost continuous sheet of cartilage³⁰. *Uhrf1* expression showed the highest levels on day 1 of culture, but the expression declined to half by day 2, progressing to more moderate levels during subsequent days of culture (Fig. 6d). At difference of *Uhrf1*, *Uhrf2* maintained uniform expression levels during the first 4 days of culture (Fig. 6e). These results are compatible with an antichondrogenic role, at least for *Uhrf1*.

To further explore their potential role in chondrogenesis, a functional analysis of *Uhrf* genes was performed by gain-of-function and loss-of-function experiments in the

micromass assay (Fig. 6f–i). Chondrogenesis was significantly downregulated in 5-day cultures of progenitors transfected with either *Uhrf1* (Fig. 6f) or *Uhrf2* (Fig. 6h) genes. In a complementary fashion, chondrogenesis was significantly upregulated after the knockdown of either *Uhrf1* (Fig. 6g) or *Uhrf2* (Fig. 6i), via transfection of the corresponding sh-RNAi.

Uhrf genes modulate cell death and cell cycle progression of skeletal progenitors

From our previous experiments, we concluded that *Uhrf* genes inhibit mesenchymal precursor differentiation. As mentioned above, skeletal progenitors that do not differentiate during limb development, undergo senescence and cell death. Therefore, we next explored whether *Uhrf* genes influenced the degenerative fate of the excess progenitors. For this purpose, changes in cell proliferation and death were analyzed in the micromass culture assay. After 2 days of culture, cell death was significantly regulated in gain-of-function and loss-of-function experiments (Fig. 7a). Over-expression of *Uhrf1* increased the number of dead cells more than three times, and its silencing decreased cell death by 25%. In turn, the over-expression of *Uhrf2* increased cell death by two-fold, and its knockdown decreased cell death by 35%. Changes in the intensity of cell death were accompanied by cell cycle arrest in the S-phase (Fig. 7b, c). Hence, the rate of cells in the S phase increased by 150% after *Uhrf1* overexpression and was reduced by 20% in loss-of-function experiments (Fig. 7b). The effect of *Uhrf2* on cell cycle progression was less consistent. *Uhrf2* overexpression increased the number of cells in S phase by 20% and silencing reduced S phase cells at a similar rate (Fig. 7c). Together, these findings are consistent with the arrest of cell cycle at S phase, as occurs in response to DNA damage.

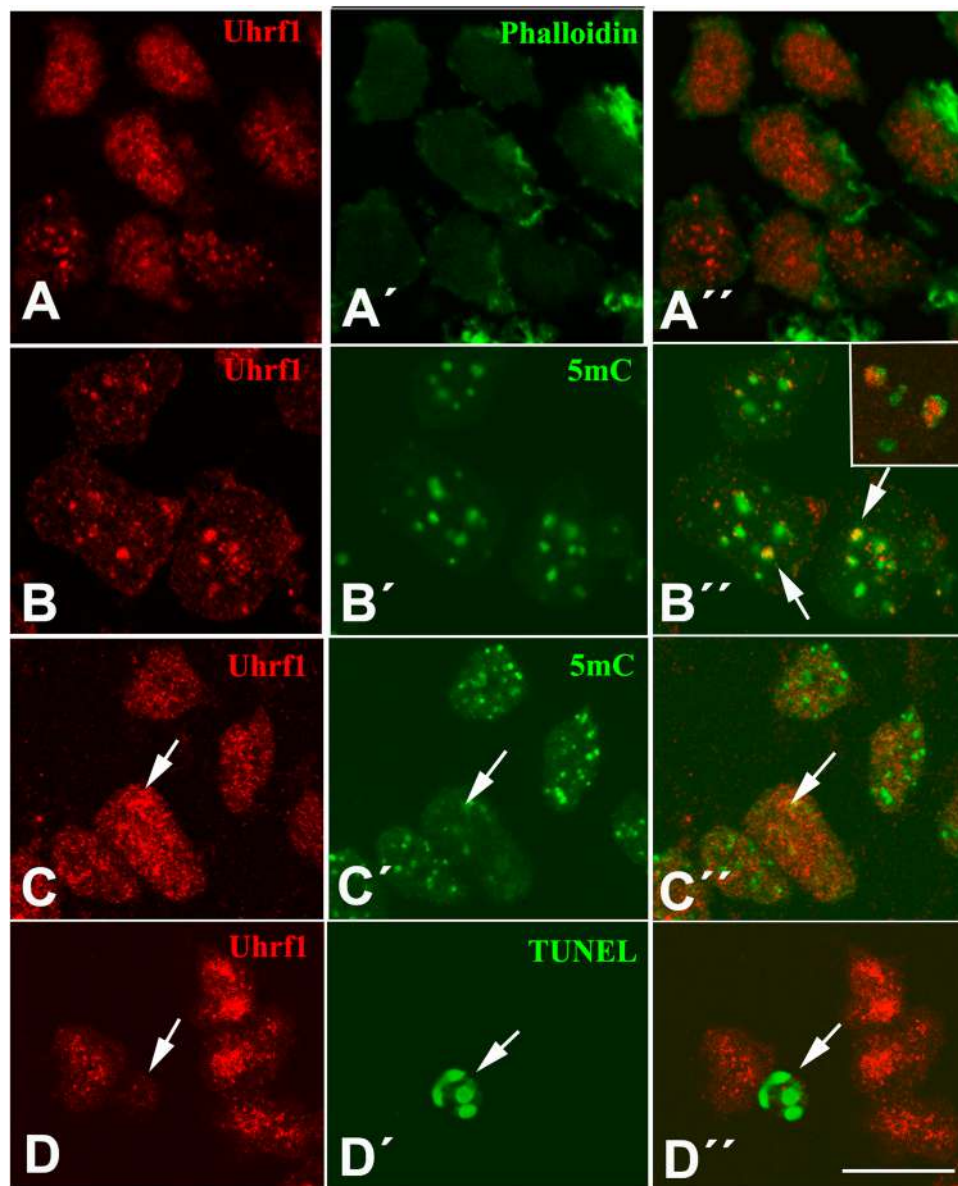


Fig. 3 UHRF1 immunolabeling (red) of chick interdigital cells at 7 id. a–a'' UHRF1 (red) in combination with phalloidin (green) show the nuclear localization of UHRF1. **(a)** UHRF1 labeling, **(a')** phalloidin labeling showing cytoplasmic actin; **(a'')** merged images. **(b–b'')** UHRF1 (red) in combination 5-mC immunolabeling (green) to show the overlapping distribution of UHRF1 in zones of DNA methylation (arrow). **(b)** UHRF1 labeling; **(b')** 5-mC immunolabeling; **(b'')** merged images; inset in this image shows the association between UHRF1 and 5-mC rings in mouse interdigital cells. **(c–c'')** Double immunolabeling for UHRF1 (red) and 5-mC (green) to show the increased UHRF1 labeling in cells with reduced DNA methylation (arrows). **(c)** UHRF1 labeling; **(c')** 5-mC immunolabeling; **(c'')** merged image. **(d–d'')** Immunolabeling of UHRF1 (red) in combination with TUNEL (green) to show the loss of UHRF1 in TUNEL-positive apoptotic cells (arrows). **(d)** UHRF1 labeling; **(d')** TUNEL labeling; **(d'')** merged image. Bar = 10 μ m

Transcriptional influence of *Uhrf* genes

UHRF factors act through the modulation of gene expression at the transcriptional level. Therefore, we next explored the influence of *Uhrf* genes in the transcription of a panel of genes associated with differentiation, proliferation, and apoptosis of limb mesenchymal progenitors (Table 1).

The dual differentiation of limb skeletal progenitors is regulated by a balance between *Sox9*, and *Scleraxis*, which are master chondrogenic and fibrogenic genes^{31,32}, respectively. Both genes regulate the dichotomic differentiation of progenitors into cartilage or fibrous tissue. Increased chondrogenesis in knockdown experiments was preceded by downregulation of *Scleraxis*, while the

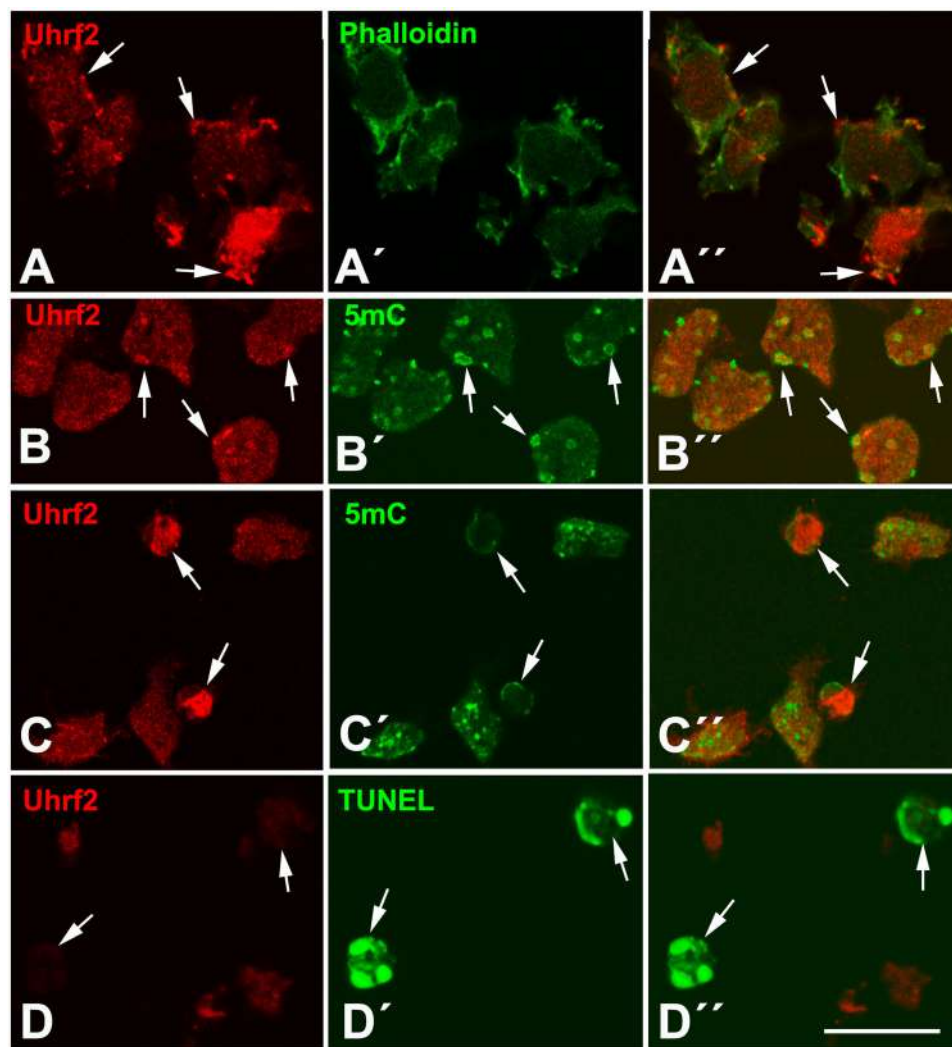


Fig. 4 UHRF2 immunolabeling of interdigital cells. UHRF2 immunolabeling (red) of chick (**a**, **c**, **d**) and mouse (**b**) interdigital cells. (**a–a''**) UHRF2 (red) in combination with phalloidin (green) showing the occurrence of both nuclear and cytoplasmic (arrow) localization of UHRF2. (**a**) UHRF2 labeling; (**a'**) phalloidin labeling showing cytoplasmic actin; (**a''**) merged images. (**b–b''**) UHRF2 (red) in combination 5-mC immunolabeling (green) to show the presence of UHRF2 positivity in the core of 5-mC rings (arrows). (**b**) UHRF2 labeling; (**b'**) 5-mC immunolabeling; (**b''**) merged images. (**c–c''**) Double immunolabeling for UHRF1 (red) and 5-mC (green), to show the increased immunolabeling in cells with reduced DNA methylation (arrows). (**c**) UHRF2 labeling; (**c'**) 5-mC immunolabeling; (**c''**) merged image. (**d–d''**) Immunolabeling of UHRF1 (red) in combination with TUNEL (green) to show the loss of UHRF2 in apoptotic cells TUNEL-positive (arrows). (**d**) UHRF1 labeling; (**d'**) TUNEL labeling; (**d''**) merged image. Bar = 10 μ m

upregulation of *Sox9* was not detectable until the overt differentiation of the micromass cultures (day 4 of culture). In contrast, the downregulation of *Sox9* in experiments of gain-of-function experiments was more precocious than the changes in the expression of *Scleraxis*.

The expression analysis of members of the *Bcl2* cell death gene family showed a significant regulation of *Bak1* in association with changes in the intensity of cell death. The overexpression of *Uhrf1* increased *Bak1* expression by 250%, while gene silencing decreased *Bak1* expression

by half. *Uhrf2* functional experiments caused a similar but more moderate regulation of *Bak1*. Other members of the *Bcl2* gene family, were either not regulated or moderately regulated (Table 1).

To explore the influence of *Uhrf* genes in cell senescence we selected *p21* as the most conspicuous marker of embryonic developmental senescence. As shown in Table 1, *p21* was upregulated six-fold after *Uhrf1* overexpression and two-fold after *Uhrf2* overexpression. In turn, *p21* was significantly downregulated after the knockdown of either *Uhrf1* (0.5 \times) or *Uhrf2* (0.3 \times).

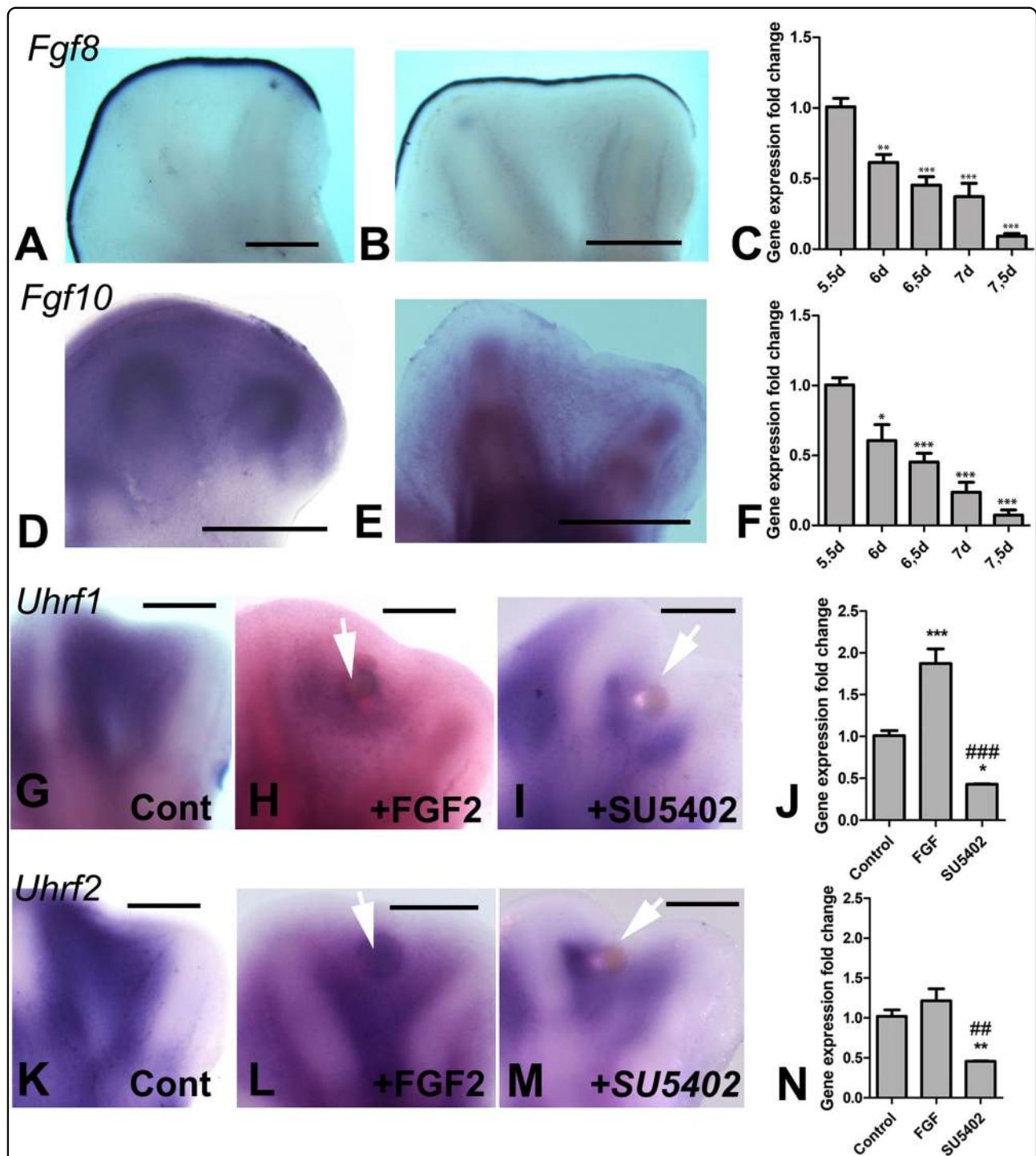


Fig. 5 Regulation of Uhrf genes by FGF signaling. **a, b** Expression of *Fgf8* in the limb marginal ectoderm (AER) at id 5.5 (**a**) and 7 (**b**). **c** q-PCR analysis of the expression decay of *Fgf8* gene expression from 5.5 to 7.5 id in samples of the interdigital tissue. **d, e** expression of *Fgf10* in the autopods at id 5.5 (**d**) and 7.5 (**e**). **f** q-PCR analysis of the expression decay of *Fgf10* gene expression from 5.5 to 7.5 id in samples of the interdigital tissue. **g–j** Regulation of *Uhrf1* by FGF signaling. **g–i** expression of *Uhrf1* in control interdigit at id 7.5 (**g**); 12 h after implantation of a FGF-bead (arrow, **h**); and 12 h after implantation of a SU5402 bead (arrow, **h**). **i** q-PCR analysis of the regulation of *Uhrf1* in control interdigits and 12 h after implantation of a FGF2 bead and SU5402 beads. **k–n** Regulation of *Uhrf2* by FGF signaling. **k–m** expression of *Uhrf2* in control interdigit at id 7.5 (**k**); 12 h after implantation of a FGF-bead (arrow, **l**); and 12 h after implantation of a SU5402 bead (arrow, **m**). **n** q-PCR analysis of the regulation of *Uhrf2* in control interdigits and 12 h after implantation of a FGF2 bead and SU5402 beads. *** $p < 0.001$; ** $p < 0.01$; * $p < 0.05$ versus control. ### $p < 0.001$; ## $p < 0.01$ between the two treatments. Bars = 200 μ m

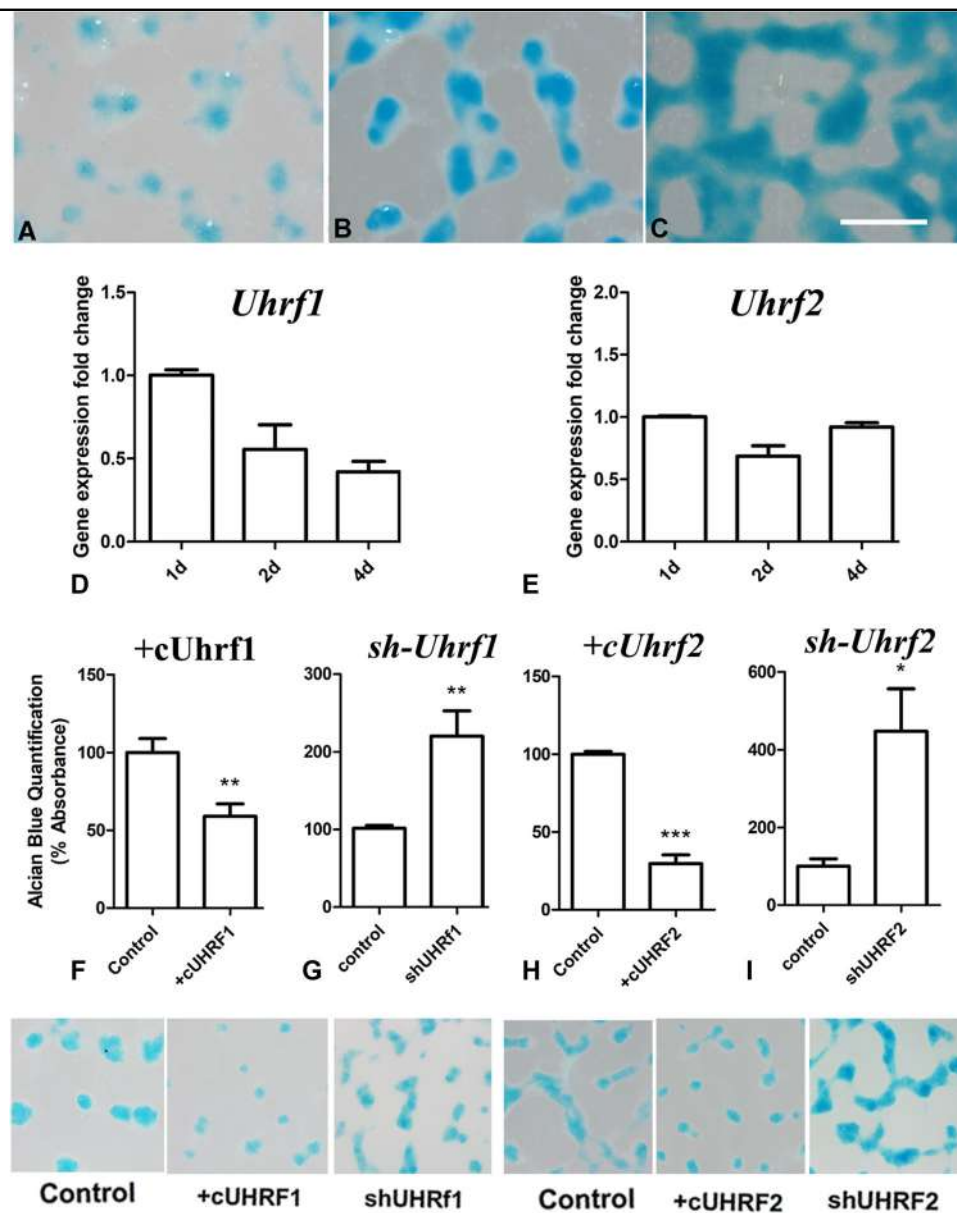


Fig. 6 *Uhrf* genes and chondrogenesis of limb skeletal progenitors. **a–c** Limb skeletal progenitors cultured at high density (micromass) for 2 (**a**), 3, (**b**) and 4 (**c**) days stained with Alcian blue for chondrogenesis. Note the increase in the size of the cartilage nodules stained in blue. Bar = 200 μ m. **d** q-PCR quantification of *Uhrf1* gene expression in micromass cultures of 1, 2, and 4 days. Note the downregulation of *Uhrf1* during the course of chondrogenic differentiation. **e** q-PCR quantification of *Uhrf2* gene expression in micromass cultures of 1, 2, and 4. In contrast to *Uhrf1*, *Uhrf2* is not downregulated in the differentiating cultures. **f–i** evaluation of cartilage differentiation by guanidine–HCl extraction of Alcian blue dye (illustrated in the lower row of pictures) in functional experiments of *Uhrf* genes gain-of-function (**f** and **h**) and loss-of-function (**g** and **i**). Note the inhibition of differentiation after the overexpression of *Uhrf1* (**f**) and *Uhrf2* (**h**), and the increased chondrogenesis after knockdown of *Uhrf1* (**g**) and *Uhrf2* (**i**). *** $p < 0.001$; ** $p < 0.01$; * $p < 0.05$ treated versus control

Regulation of DNA methylation by Uhrf genes

Considering the functional implication of UHRFs in genomic DNA methylation, we first analyzed changes in global methylation in micromass cultures subjected to *Uhrf* gene overexpression or silencing. Global methylation was significantly increased in 2-day cultures transfected with

Uhrf1 or *Uhrf2* genes (Fig. 8a), but was not modified at statistical significant levels when progenitors were subjected to *Uhrf*'s gene silencing. However, we detected a mild decrease in global methylation after *Uhrf1* gene silencing.

To address the functional significance of methylation in the regulation of cell death by *Uhrf* genes, we select *Bak1*

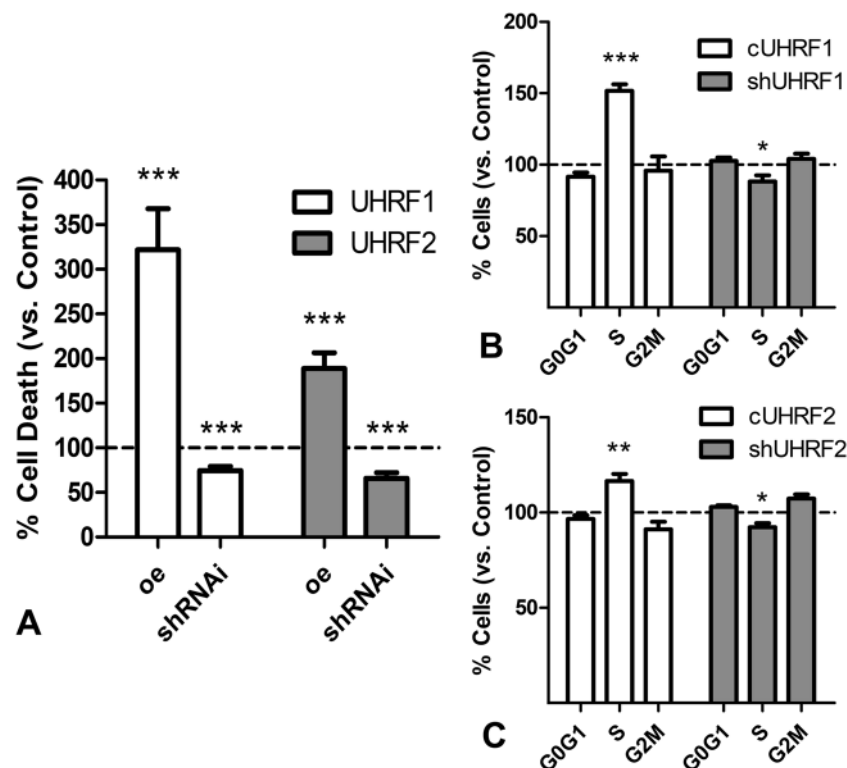


Fig. 7 Regulation of cell death and cell cycle by UHRFs. **a** Chart showing differences in the intensity of cell death evaluated by flow cytometry between control progenitors and progenitors overexpressing (oe) or subjected to silencing (shRNAi) of *Uhrf1* (white columns) and *Uhrf2* (gray columns). The level of cell death in control cultures was considered 100% and is represented by the dotted line. **b** Graphic illustrations comparing the proportion of cells at different cell cycle stages in cultures overexpressing *Uhrf1* (white columns) and after gene silencing (gray columns) versus control cultures (represented by the dotted line). **c** Graphic illustrations comparing the proportion of cells at different cell cycle stages in cultures overexpressing *Uhrf2* (white columns) and after gene silencing (gray columns) versus control cultures (represented by the dotted line). *** $p < 0.001$; ** $p < 0.01$; * $p < 0.05$ treated versus control

to explore methylation changes in CpG islands of its promoter by MSRE-qPCR (Fig. 8b). Gain-of-function experiments of both *Uhrf1* or *Uhrf2* were followed by decreased methylation. The decrease was particularly intense after *Uhrf1* overexpression, and more moderated for *Uhrf2*. As observed for global methylation, gene silencing did not change at significant levels methylation of *Bak1* promoter.

Functional redundancy of *Uhrf* genes

We first analyzed the influence of *Uhrf* genes on the expression of each other. As shown in Table 1, neither overexpression nor gene silencing of the *Uhrf1* gene regulated the expression of *Uhrf2* at significant levels. However, overexpression and silencing of *Uhrf2* were followed by a moderate regulation of *Uhrf1*.

We next analyzed by flow cytometry changes in cell death in combined transfections of overexpression plasmids and sh-RNA inhibitory constructs (Supplementary Fig. 2A, B). Transfection of *Uhrf2* in combination with shRNAi-*Uhrf1* neutralized the cell death promoting effect

of *Uhrf2* (Supplementary Fig. 2A). In these experiments, the intensity of cell death became similar to that observed after transfections with shRNAi-*Uhrf1* only. In a similar fashion, the inhibitory influence on cell death of sh-RNAi-*Uhrf2* was also abolished when it was co-transfected with *Uhrf1* (Supplementary Fig. 2B). Finally, the increased cell death induced separately by *Uhrf1* or *Uhrf2* lacked statistically significant differences with the level of cell death induced by double transfections with both *Uhrf* genes (Supplementary Fig. 2C). Together, these findings suggest common and complementary roles for both genes in the embryonic limb mesoderm.

Discussion

Current knowledge of the role of UHRF proteins in developing vertebrates is scarce because mouse KO for *Uhrf1* die early in gestation³³, and mice deficient in *Uhrf2* lack skeletal phenotype¹⁸. However, the implication of *Uhrf1* in the formation and growth of various organs has been observed in mutant zebrafish embryos¹⁶, and the influence of *Uhrf1* in cartilage maturation, has been

demonstrated via a conditional knockout (*Uhrf1*-cKO) targeted to the limb mesoderm¹⁷. The skeletal phenotype of *Uhrf1*-cKO mice provided evidence for a role for UHRF1 in the elongation of appendicular bones during the postnatal period by regulating the growth and differentiation of the growth plates. Our study extends the function of these genes to the stages of digit

Table 1 Transcriptional analysis of limb progenitors subjected to gain-of-function and loss-of-function of either *Uhrf1* or *Uhrf2* genes

	cUhrf1	shUhrf1	cUhrf2	shUhrf2
<i>Differentiation markers</i>				
<i>Scx</i>	1.02 ± 0.11	0.59 ± 0.06***	1.17 ± 0.20	0.50 ± 0.09***
<i>Sox9</i>	0.59 ± 0.07***	0.93 ± 0.09	0.59 ± 0.08***	0.80 ± 0.15
<i>Senescence marker</i>				
<i>p21</i>	6.18 ± 1.98*	0.56 ± 0.07***	2.36 ± 0.35**	0.38 ± 0.08***
<i>Cell death markers</i>				
<i>Bcl2</i>	1.24 ± 0.10	1.12 ± 0.06	0.89 ± 0.07	1.01 ± 0.14
<i>Bak1</i>	2.44 ± 0.51**	0.59 ± 0.03***	1.80 ± 0.34*	0.80 ± 0.10
<i>Bid</i>	1.45 ± 0.21	0.85 ± 0.06	1.24 ± 0.15	0.92 ± 0.15
<i>Bim</i>	0.99 ± 0.04	1.24 ± 0.12	0.91 ± 0.19	0.98 ± 0.12
<i>Bmf</i>	1.72 ± 0.31*	0.94 ± 0.08	1.02 ± 0.13	0.89 ± 0.14
<i>Uhrf1</i>	10.33 ± 2.88**	0.44 ± 0.03***	1.98 ± 0.35*	0.69 ± 0.07***
<i>Uhrf2</i>	1.26 ± 0.12	0.95 ± 0.05	10.31 ± 2.53**	0.50 ± 0.04***

The panel of genes analyzed included markers for skeletogenic differentiation, senescence, and apoptosis

****p* < 0.001; ***p* < 0.01; **p* < 0.05 treated versus control

Statistic significant values are highlighted in bold

skeletogenesis. Our study showed that *Uhrf* genes inhibit the chondrogenesis of skeletal progenitors. This function contrasts with the requirement of UHRF1 for the differentiation of postnatal chondrocytes grown in micromass culture¹⁷. These different effects emphasize the dependence of *Uhrf* genes on their functions of factors whose presence in the cells is related to the stage of differentiation. In the embryo, the expression domains of *Uhrf1* and *Uhrf2* specifically mark undifferentiated progenitors. Furthermore, in the case of *Uhrf1*, the level of expression in vitro becomes progressively reduced in parallel with the differentiation of the progenitors into chondrocytes. These observations support a role for *Uhrf* genes, especially *Uhrf1*, in the maintenance of progenitors in an undifferentiated state.

We identified *Sox9* and *Scleraxis*, as potential mediators for the antichondrogenic influence of UHRFs on the skeletal progenitors. *Sox9* belongs to the high-mobility group of chromatin regulators and plays a central role in the differentiation of skeletal progenitors^{34–36}. *Scleraxis*, is a basic helix-loop-helix transcription factor structurally associated with *Sox9* and is involved in the formation of fibrous connective tissues^{31,35}. *Sox9* promotes the onset of chondrogenic differentiation in the developing limb and its silencing leads to cell death of skeletal progenitors^{34,37}. The function of SOX9 is modulated by epigenetic mechanisms via histone acetylation on chromatin³⁵. Remarkably, in our study, the chondrogenic inhibition and increased cell death in *Uhrf* gene gain-of-function experiments involved a precocious downregulation of *Sox9*. In contrast, increased chondrogenesis in loss-of-function experiments were preceded by downregulation of *Scleraxis*. This finding suggests a double and complementary function of *Uhrf* genes via the activation or

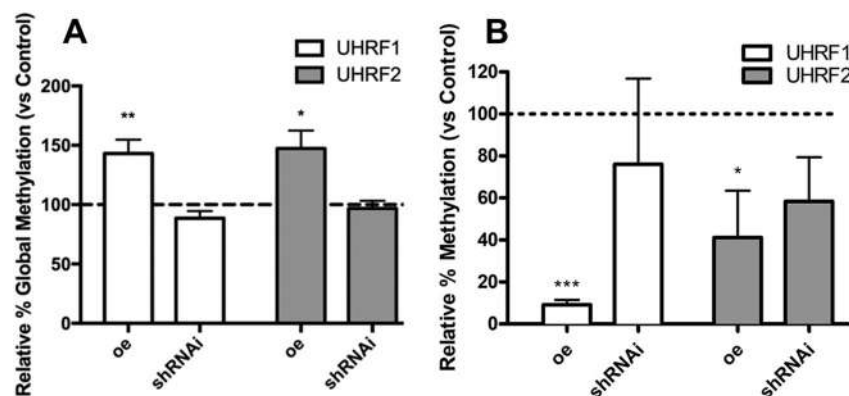


Fig. 8 Changes in DNA methylation by UHRFs. **a** Chart showing differences in global methylation evaluated by ELISA between control progenitors and progenitors overexpressing (oe) or subjected to silencing (shRNAi) of *Uhrf1* (white columns) and *Uhrf2* (gray columns). The level of global methylation in control cultures was considered 100% and is represented by the dotted line. **b** Methylation level of CpG islands in the *Bak1* promoter evaluated by MSRE-qPCR between control progenitors and progenitors overexpressing (oe) or subjected to silencing (shRNAi) of *Uhrf1* (white columns) and *Uhrf2* (gray columns). The level of CpG methylation in control cultures was considered 100% and is represented by the dotted line.

****p* < 0.001; ***p* < 0.01; **p* < 0.05 treated versus control

repression of the promoters of master genes that establish the fate of the skeletal progenitors.

UHRF proteins play pivotal functions in carcinogenesis modulating DNA methylation and the histone functional code of tumor cells^{38–40}. Consistent with these facts, here we show that both *Uhrf* genes promote global methylation in skeletal progenitors. Changes induced in cancer cells by dysregulation of *Uhrf* genes include cell proliferation, cell senescence, apoptosis, increased metastatic potential, and increased sensitivity to DNA-damaging agents^{14,15,40–44}. In most cases the function of UHRF proteins takes place in coordination with other chromatin-modifying proteins⁴⁴. This feature explains that the function of UHRF proteins varies in a cell cycle-dependent and cell lineage-dependent manner.

The degenerative events accounting for interdigit remodeling occur in a sequential fashion. In the 12–24 h preceding the onset of massive apoptosis, the interdigital cells undergo proliferation arrest²⁴, and intense DNA damage⁵. These changes are next followed by senescence⁴ and massive apoptosis to accomplish interdigit removal. Between id 5.5 and id 6, we observed a partial decrease in the interdigital expression of *Uhrf1* that correlated with the down-regulation of FGF genes at the end of limb morphogenesis. In subsequent stages of degeneration (from id 6.5 to id 8) both UHRF1 and UHRF2 maintained elevated protein and transcriptional expression levels, suggesting an active participation of both UHRF proteins in tissue regression.

Our functional approaches established the implication of both *Uhrf* genes in the regulation of the cell death of skeletal progenitors, and in the expression of *p21*, a gene that plays a pivotal role in embryonic developmental senescence⁴. Additionally, the overexpression of *Uhrf* genes arrested the cell cycle in S phase, a characteristic feature of senescent cells associated with DNA damage. Cell death appeared significantly upregulated in progenitors overexpressing either *Uhrf1* or *Uhrf2*, and significantly reduced in loss-of-function experiments of either gene. UHRFs have been implicated in the regulation of apoptosis in tumoral systems by distinct mechanisms, including the transcriptional regulation of tumor suppressor genes³⁸, selective regulation of proapoptotic genes^{14,45}, the induction of global hypomethylation leading to changes in tumor radiosensitivity³⁹, or by reducing the capacity to repair DNA damage⁴⁶. Remarkably, in our experimental system the intensification and attenuation of cell death correlated with changes in the expression of *Bak1*, a characteristic proapoptotic member of the *Bcl2* gene family with a demonstrated role in the regression of the interdigits⁴⁷. Furthermore, up-regulation of *Bak1* was associated with hypomethylation of the CpG islands of its promoter.

In normal cells, UHRF1 participates in the regulation of the cell cycle, and in cooperation with the DNA methyl

transferase 1 (DNMT1), UHRF1 maintains the DNA methylation status of dividing cells. It has been proposed that *Uhrf1* plays a primary role in cell senescence regulating the expression DNMT1⁴⁸. In our system, DNMT1 was not regulated by *Uhrf1* or *Uhrf2* (unpublished observation), but, in turn, we detected an intense regulation of the cell senescence master gene *p21* indicative of the direct implication of these genes in cell senescence. A similar regulation of *p21* by *Uhrf1* has been reported in a number of systems^{44,49}. However, in some tumoral cell lineages, UHRF1 and UHRF2 exerted negative transcriptional influence on the expression of *p21*⁵⁰. This discrepancy is explained by the importance of specific cofactors that, together with UHRFs, form heteromeric binding complexes in the promoters of target genes, modulating their functions in a cell-cycle and cell-lineage-dependent manner⁴⁴.

In conclusion, our study uncovers a new level of regulation of interdigital apoptosis and cell senescence upstream of the components of the intrinsic pathway responsible for executing cell death in embryonic systems. Furthermore, our findings indicate that the balance between cell differentiation and cell stemness may be a central step in the initiation of the so-called “programmed cell death” associated with embryonic morphogenesis. The epigenetic functional profile of *Uhrf* genes in most studied systems, together with the changes in DNA methylation observed in our functional experiments, suggests that the structural organization of the chromatin may be a critical factor in the regulation of embryonic cell death and cell senescence.

Acknowledgements

We thank Montse Fernandez Calderon, Susana Dawalibi, and Sonia Perez Mantecon, for excellent technical assistance. This work was supported by a Grant (BFU2017-84046-P) from the Spanish Science and Innovation Ministry to J.A.M.

Conflict of interest

The authors declare that they have no conflict of interest.

Publisher's note

Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

Supplementary information accompanies this paper at (<https://doi.org/10.1038/s41419-019-1575-4>).

Received: 18 December 2018 Revised: 26 March 2019 Accepted: 4 April 2019

Published online: 25 April 2019

References

1. Hurler, J. M. & Gañan, Y. Formation of extra-digits induced by surgical removal of the apical ectodermal ridge of the chick-embryo leg bud in the stages previous to the onset of interdigital cell-death. *Anat. Embryol.* **176**, 393–399 (1987).

2. Zuzarte-Luis, V., Montero, J. A., Kawakami, Y., Izpisua-Belmonte, J. C. & Hurler, J. M. Lysosomal cathepsins in embryonic programmed cell death. *Dev. Biol.* **301**, 205–217 (2007).
3. Arakawa, S. et al. Role of Atg5-dependent cell death in the embryonic development of Bax/Bak double-knockout mice. *Cell Death Differ.* **24**, 1598–1608 (2017).
4. Lorda-Diez, C. I. et al. Apoptosis during embryonic tissue remodeling is accompanied by cell senescence. *Aging* **7**, 974–985 (2015).
5. Montero, J. A., Sanchez-Fernandez, C., Lorda-Diez, C. I., Garcia-Porrero, J. A. & Hurler, J. M. DNA damage precedes apoptosis during the regression of the interdigital tissue in vertebrate embryos. *Sci. Rep.* **6**, 35478 (2016).
6. Zuzarte-Luis, V. et al. A new role for BMP5 during limb development acting through the synergic activation of Smad and MAPK pathways. *Dev. Biol.* **272**, 39–52 (2004).
7. Nebbioso, A., Tambaro, F. P., Dell'Aversana, C. & Altucci, L. Cancer epigenetics: moving forward. *PLoS Genet.* **14**, e1007362 (2018).
8. Liu, X. et al. Self-inflicted DNA double-strand breaks sustain tumorigenicity and stemness of cancer cells. *Cell Res.* **27**, 764–783 (2017).
9. Palla, V. V. et al. Gamma-H2AX: can it be established as a classical cancer prognostic factor? *Tumour Biol.* **39**, 1010428317695931 (2017).
10. Bronner, C. et al. The UHRF family: oncogenes that are druggable targets for cancer therapy in the near future? *Pharmacol. Ther.* **115**, 419–434 (2007).
11. Un, F. et al. Modulating ICBP90 to suppress human ribonucleotide reductase M2 induction restores sensitivity to hydroxyurea cytotoxicity. *Anticancer Res.* **26**, 2761–2767 (2006).
12. Mistry, H. et al. UHRF1 is a genome caretaker that facilitates the DNA damage response to gamma-irradiation. *Genome Integr.* **1**, 7 (2010).
13. Iwata, A. et al. Intranuclear degradation of polyglutamine aggregates by the ubiquitin-proteasome system. *J. Biol. Chem.* **284**, 9796–9803 (2009).
14. Lu, H. & Hallstrom, T. C. The nuclear protein UHRF2 is a direct target of the transcription factor E2F1 in the induction of apoptosis. *J. Biol. Chem.* **288**, 23833–23843 (2013).
15. Muto, M. et al. Targeted disruption of Np95 gene renders murine embryonic stem cells hypersensitive to DNA damaging agents and DNA replication blocks. *J. Biol. Chem.* **277**, 34549–34555 (2002).
16. Jacob, V. et al. DNA hypomethylation induces a DNA replication-associated cell cycle arrest to block hepatic outgrowth in Uhrf1 mutant zebrafish embryos. *Development* **142**, 510–521 (2015).
17. Yamashita, M. et al. Uhrf1 is indispensable for normal limb growth by regulating chondrocyte differentiation through specific gene expression. *Development* **145**, dev157412 (2018).
18. Chen, R. et al. The 5-Hydroxymethylcytosine (5hmC) reader UHRF2 is required for normal levels of 5hmC in mouse adult brain and spatial learning and memory. *J. Biol. Chem.* **292**, 4533–4543 (2017).
19. Chen, X. R. et al. Uhrf2 deletion impairs the formation of hippocampus-dependent memory by changing the structure of the dentate gyrus. *Brain Struct. Funct.* **223**, 609–618 (2018).
20. Debacq-Chainiaux, F., Erusalimsky, J. D., Campisi, J. & Toussaint, O. Protocols to detect senescence-associated beta-galactosidase (SA-beta-gal) activity, a biomarker of senescent cells in culture and in vivo. *Nat. Protoc.* **4**, 1798–1806 (2009).
21. Montero, J. A. et al. Role of FGFs in the control of programmed cell death during limb development. *Development* **128**, 2075–2084 (2001).
22. Krygier, M., Podolak-Popinigis, J., Limon, J., Sachadyn, P. & Stanislawski-Sachadyn, A. A simple modification to improve the accuracy of methylation-sensitive restriction enzyme quantitative polymerase chain reaction. *Anal. Biochem.* **500**, 88–90 (2016).
23. Furusawa, T. et al. Down-regulation of nucleosomal binding protein HMGN1 expression during embryogenesis modulates Sox9 expression in chondrocytes. *Mol. Cell. Biol.* **26**, 592–604 (2006).
24. Tone, S. & Tanaka, S. Analysis of relationship between programmed cell death and cell cycle in limb-bud. *Horm. Res.* **48**(Suppl. 3), 5–10 (1997).
25. Fernández-Terán, M. A., Hinchliffe, J. R. & Ros, M. A. Birth and death of cells in limb development: a mapping study. *Dev. Dyn.* **235**, 2521–2537 (2006).
26. Salas-Vidal, E., Valencia, C. & Covarrubias, L. Differential tissue growth and patterns of cell death in mouse limb autopod morphogenesis. *Dev. Dyn.* **220**, 295–306 (2001).
27. Mariani, F. V., Ahn, C. P. & Martin, G. R. Genetic evidence that FGFs have an instructive role in limb proximal-distal patterning. *Nature* **453**, 401–405 (2008).
28. Niswander, L. & Martin, G. R. FGF-4 and BMP-2 have opposite effects on limb growth. *Nature* **361**, 68–71 (1993).
29. Lorda-Diez, C. I., Montero, J. A., Choe, S., Garcia-Porrero, J. A. & Hurler, J. M. Ligand- and stage-dependent divergent functions of BMP signaling in the differentiation of embryonic skeletogenic progenitors in vitro. *J. Bone Miner. Res.* **29**, 735–748 (2014).
30. Lorda-Diez, C. I., Montero, J. A., Garcia-Porrero, J. A. & Hurler, J. M. The tumor suppressor BTG1 is expressed in the developing digits and regulates skeletogenic differentiation of limb mesodermal progenitors in high density cultures. *Cell Tissue Res.* **364**, 299–308 (2016).
31. Asou, Y. et al. Coordinated expression of scleraxis and Sox9 genes during embryonic development of tendons and cartilage. *J. Orthop. Res.* **20**, 827–833 (2002).
32. Lorda-Diez, C. I., Montero, J. A., Garcia-Porrero, J. A. & Hurler, J. M. Divergent differentiation of skeletal progenitors into cartilage and tendon: lessons from the embryonic limb. *ACS Chem. Biol.* **9**, 72–79 (2014).
33. Bostick, M. et al. UHRF1 plays a role in maintaining DNA methylation in mammalian cells. *Science* **317**, 1760–1764 (2007).
34. Chimal-Monroy, J. et al. Analysis of the molecular cascade responsible for mesodermal limb chondrogenesis: Sox genes and BMP signaling. *Dev. Biol.* **257**, 292–301 (2003).
35. Furumatsu, T. & Asahara, H. Histone acetylation influences the activity of Sox9-related transcriptional complex. *Acta Med. Okayama* **64**, 351–357 (2010).
36. Liu, C. F., Angelozzi, M., Haseeb, A. & Lefebvre, V. SOX9 is dispensable for the initiation of epigenetic remodeling and the activation of marker genes at the onset of chondrogenesis. *Development* **145**, dev164459 (2018).
37. Akiyama, H., Chaboissier, M. C., Martin, J. F., Schedl, A. & de Crombrughe, B. The transcription factor Sox9 has essential roles in successive steps of the chondrocyte differentiation pathway and is required for expression of Sox5 and Sox6. *Genes Dev.* **16**, 2813–2828 (2002).
38. Choudhry, H. et al. Targeting microRNA/UHRF1 pathways as a novel strategy for cancer therapy. *Oncol. Lett.* **15**, 3–10 (2018).
39. Jia, Y. et al. Negative regulation of DNMT3A de novo DNA methylation by frequently overexpressed UHRF family proteins as a mechanism for widespread DNA hypomethylation in cancer. *Cell Discov.* **2**, 16007 (2016).
40. Ashraf, W. et al. The epigenetic integrator UHRF1: on the road to become a universal biomarker for cancer. *Oncotarget* **8**, 51946–51962 (2017).
41. Patnaik, D., Estève, P. O. & Pradhan, S. Targeting the SET and RING-associated (SRA) domain of ubiquitin-like, PHD and ring finger-containing 1 (UHRF1) for anti-cancer drug development. *Oncotarget* **9**, 26243–26258 (2018).
42. Tien, A. L. et al. UHRF1 depletion causes a G2/M arrest, activation of DNA damage response and apoptosis. *Biochem. J.* **435**, 175–185 (2011).
43. Zhou, L. et al. Regulation of UHRF1 by miR-146a/b modulates gastric cancer invasion and metastasis. *FASEB J.* **27**, 4929–4939 (2013).
44. Beck, A. et al. Overexpression of UHRF1 promotes silencing of tumor suppressor genes and predicts outcome in hepatoblastoma. *Clin. Epigenetics* **10**, 27 (2018).
45. Ge, T. T., Yang, M., Chen, Z., Lou, G. & Gu, T. UHRF1 gene silencing inhibits cell proliferation and promotes cell apoptosis in human cervical squamous cell carcinoma CaSki cells. *J. Ovarian Res.* **9**, 42 (2016).
46. Yang, C. et al. Inhibiting UHRF1 expression enhances radiosensitivity in human esophageal squamous cell carcinoma. *Mol. Biol. Rep.* **40**, 5225–5235 (2013).
47. Ke, F. F. S. et al. Embryogenesis and adult life in the absence of intrinsic apoptosis effectors BAX, BAK, and BOK. *Cell* **173**, 1217–1230.e17 (2018).
48. Jung, H. J. et al. The ubiquitin-like with PHD and ring finger domains 1 (UHRF1)/DNA methyltransferase 1 (DNMT1) axis is a primary regulator of cell senescence. *J. Biol. Chem.* **292**, 3729–3739 (2017).
49. Obata, Y. et al. The epigenetic regulator Uhrf1 facilitates the proliferation and maturation of colonic regulatory T cells. *Nat. Immunol.* **15**, 571–579 (2014).
50. Kim, J. K., Estève, P. O., Jacobsen, S. E. & Pradhan, S. UHRF1 binds G9a and participates in p21 transcriptional regulation in mammalian cells. *Nucleic Acids Res.* **37**, 493–505 (2009).

